



**Europäisches  
Patentamt**

**European  
Patent Office**

**Office européen  
des brevets**

**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

**Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°**

97101338.8

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**I.L.C. HATTEN-HECKMAN**

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE, 03/10/00  
LA HAYE, LE



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: 97101338.8  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 29/01/97  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Flöhé, Leopold, Prof. Dr.  
38304 Wolfenbüttel  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Test-kit für Tuberkulose- Diagnose etc.

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:

C12Q1/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:

## 1. Einleitung

### 1.1 Tuberkulose damals und heute

Im Jahre 1992 wurde die Tuberkulose von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als "*global disease*" deklariert. Seitdem ist diese Infektionskrankheit wieder etwas mehr in das Licht der Öffentlichkeit gerückt. Nachdem sie weitgehend schon fast in Vergessenheit geraten war, erzeugt sie seit einigen Jahren wieder steigende Infektions- und Mortalitätsraten (Bloom & Murray, 1992; Snider Jr. & Roper, 1992; Young & Cole, 1993). So sind es zur Zeit an die 3 Millionen Menschen, die jährlich Opfer dieser Seuche werden. In Deutschland liegt diese Zahl bei etwa 1000 Todesfällen jährlich.

Dieser Trend der letzten Jahre läßt geographisch kaum einen Punkt dieser Erde außer Acht. Risikogruppen lassen sich am besten demographisch abgrenzen. Einen wichtigen Einfluß spielen hierbei die parallel grassierende HIV-Epidemie (Selwyn *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1991; Snider Jr. & Roper, 1992; l'Herminez, 1993), mangelnde hygienische Verhältnisse, schlechte oder unausgewogene Ernährung, die steigende Zahl der Obdachlosen und Drogenabhängigen und die oft mangelnden nationalen Tuberkulose-Kontrollprogramme (Bloom & Murray, 1992). All diese Faktoren, vor allem wenn sie in Kombination anzutreffen sind, tragen zur Ausbreitung der Krankheit bei.

Trotzdem ist das Ausmaß des Wiederauflebens dieser Krankheit nicht mit den großen Epidemien im Mittelalter oder im frühen 19. Jahrhundert vergleichbar. Seinerzeit wurden ganze Stadtteile und Landstriche dahingerafft. Die Menschen standen der Seuche, im Vergleich zu heute, völlig hilflos gegenüber (Ruffié & Sournia, 1992; Pasoval, 1993). Es wurden noch keinerlei Maßnahmen unternommen um der Seuche Einhalt zu gebieten.

Dies änderte sich erst ab Mitte des 19. Jahrhunderts, als man damit begann, die Kranken in Tuberkulose-Sanatorien einzuweisen, die sich an Orten mit besonders zuträglicher Luft, bei uns vor allem an der Ostsee und in den Alpen, befanden. Als

Beginn der gezielten mykobakteriologischen Wissenschaftsgeschichte kann das Jahr 1882 bezeichnet werden, in dem Robert Koch als erster die Ätiologie der Tuberkulose beschrieb (Koch, 1882; Koch 1890).

Im Jahr 1908 gelang es Albert Calmette und Camille Guérin eine morphologische Variante des Stammes *Mycobacterium bovis* zu isolieren (Calmette, 1927), den nach ihnen benannten Stamm BCG. Dies ist noch heute der einzige Impfstoff gegen die Tb. Die Berichte über seine Effizienz sind jedoch sehr widersprüchlich (Ferebee, 1970; National Tuberculosis Institute-Bangalore, 1974; d'Esopo, 1982; Luelmo, 1982; Fine, 1989). Eine Impfung wird deshalb nicht generell empfohlen, sondern richtet sich nach den lokalen Gegebenheiten. Selbst in Deutschland wird die Vakzinierung von Neugeborenen von Bundesland zu Bundesland verschieden gehandhabt.

In den letzten drei Jahren haben jedoch interessante Entwicklungen auf dem Gebiet der Vakzin-Entwicklung stattgefunden. Vielversprechende Ergebnisse wurden von Schutzexperimenten mit bioabbaubaren Mikropartikeln (Vordermeier *et al.*, 1995a) und von DNA-Immunisierungen gemeldet (Tascon *et al.*, 1996; Huygen *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1996).

1912 wurde zum ersten Male eine Substanz namens Isonicotinsäurehydrazid (INH) synthetisiert. Bis die Wirksamkeit dieses Stoffes erkannt wurde, und dieser auch für klinische Zwecke erhältlich war, dauerte es noch weitere 40 Jahre. Doch heute noch ist INH eines der fünf bis sechs Antibiotika (INH, Ethambutol, Pyrazinamid, Rifampicin, Streptomycin, Thioacetazon), die als Primärwaffen gegen eine Tb eingesetzt werden. Welche Kombination dieser Antibiotika aber am besten anschlägt, ist, wegen der in letzter Zeit zunehmenden Zahl Antibiotika-resistenter Isolate, sehr unterschiedlich und schwer zu generalisieren. Ziel muß es also sein, neue Formen und Angriffspunkte medikamentöser Wirkstoffe zu eruieren. Von alleine wird sich auf jeden Fall kein *Deus ex machina* einfinden.

Unter den erwähnten Antibiotika hat INH die seltene Gabe, hochspezifisch für Mykobakterien zu sein. Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, dem Grund hierfür auf die Spur zu kommen, der mit der einzigartigen Struktur der mykobakteriellen



Zellwand zusammenhängt. INH interveniert bei der Synthese einer der für Mykobakterien spezifischen Komponenten der Zellwand, den sogenannten Mycolsäuren (Zhang *et al.*, 1992; Heym *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Banerjee *et al.*, 1994; Dessen *et al.*, 1995; Rouse & Morris, 1995).

Ein weiteres Problem stellt oft auch die Diagnose der Krankheit dar. Eine frühe Erkennung und sofort einsetzende Maßnahmen sind aber der beste Schutz gegen eine weitere Ausbreitung der Krankheit. Eine Auflistung typischer Tuberkulose-Symptome stellt aber eher ein Sammelsurium von Merkmalen dar, wie sie oft auch bei anderen lapidareren Krankheiten auftreten, als daß es sich bei ihnen um sichere Indizien für eine Tuberkulose handelt. Oft werden deshalb zuerst andere falsche Diagnosen gestellt, bevor man sich über das Vorhandensein einer Tb im Klaren ist. Die häufigste Fehldiagnose ist die einer Bronchitis.

Der gängige Tuberkulin-Test, bei dem eine Proteinpräparation des Erregers unter die Haut injiziert wird (es gibt hierbei zwei Testverfahren, den Mantoux- und den PPD-Test), ist unzuverlässig, und vermag zudem nicht zwischen einer Infektion mit *M.tuberculosis* und einer Impfung mit *M.bovis* BCG zu unterscheiden (Bass Jr. *et al.*, 1990; Huebner *et al.*, 1993). Auch eine bereits abgeheilte Tb oder Kreuzreaktionen mit in der Natur vorkommenden Mykobakterien können zu einem positiven Tuberkulin-Test führen. Er stellt deshalb eher eine Methode dar, um Infektionen auszuschließen. Bei einem positiven Test müssen andere Verfahren zur weiteren Untersuchung herangezogen werden.

An solchen anderen Verfahren mangelt es aber. Sie sind entweder nicht zuverlässig, sehr aufwendig, langwierig oder teuer, und aus diesen Gründen in vielen Epidemiegebieten nicht einsetzbar. Hierzu zählen z.B. die Kultivierung von Biopsieproben, serologische Diagnoseverfahren, die PCR oder die Analyse von mykobakterien-spezifischen Zellwandbestandteilen mittels Gaschromatographie (Arya *et al.*, 1993; Savage *et al.*, 1993; Zambardi *et al.*, 1993; Bothamley & Rudd, 1994; Cooksey & Crawford, 1994; Kolk *et al.*, 1994; Verbon, 1994; Zolg & Philippi-Schulz,

1994; Amicosante *et al.*, 1996; Beige *et al.*, 1995). Eines der Verfahren mit erheblichem Potential ist der Pathozyme-Tb Complex Kit (Omega). Dieser Assay beruht auf dem serologischen Nachweis des rekombinanten 38 kD-Antigens aus *E.coli* (Singh *et al.*, 1992). Dieses Protein scheint für immundiagnostische Verfahren sehr vielversprechend zu sein (Wilkinson *et al.*, 1996).

## 1.2 Eine große Familie

Der Begriff *Mycobakterium* wird in der Regel mit dem Erreger der Tuberkulose assoziiert. Daß dies nicht so ist, soll an dieser Stelle kurz angedeutet werden. Der Term *Mycobakterium* beschreibt eine Gattung von Bakterien, deren einzige Familie die der *Mycobacteriaceae* ist (Runyon *et al.*, 1975; Good, 1992; Hartmans & de Bont, 1992; Nayne & Kubica, 1986; Roberts *et al.*, 1991; Winn & Evans, 1994; Winn & Meier, 1994; Winn & Prechter, 1994; diesen Referenzen liegen auch alle anderen taxonomischen Fakten zugrunde). Die genaue Anzahl der Spezies, die in diese Familie fallen, ist schwer zu nennen, da ständig neue hinzukommen oder mehrere ältere zu einem einzigen neuen Stamm umklassifiziert werden. Es gibt aber wohl mit Sicherheit mehr als 60 Vertreter, von denen etwa gut die Hälfte pathogen ist. Das Hauptmerkmal der *Mycobacteriaceae* ist die sogenannte Säurefestigkeit oder *acid-fastness*. Dahinter verbirgt sich die Eigenschaft, sich nach Anfärbung mit einem basischen Farbstoff, in der Praxis meist Fuchsin, nicht wieder mit sauren organischen Lösungsmitteln entfärben zu lassen (Smithwick, 1976; Barksdale & Kim, 1977; Goren *et al.*, 1978).

Die bekannteste Gruppe innerhalb der Mykobakterien ist die des sogenannten *M.tuberculosis* Complex. Seine vier Vertreter sind allesamt pathogen. Die in nachfolgender Tabelle (Tab. 1.1) aufgeführten Wirtsspektren dürfen nicht mit experimentellen Infektionen verwechselt werden. Angegeben sind vielmehr diejenigen Organismen, bei denen natürlich vorkommende Infektionen mit dem jeweiligen Stamm auftreten.

Tab. 1.1 : Die Vertreter des *M.tuberculosis* Complex

Angegeben ist das jeweils natürliche Wirtsspektrum.

| Organismus            | Wirtsspektrum  |
|-----------------------|--|
| <i>M.tuberculosis</i> | Mensch, Primaten, Hunde, Meerschweinchen, Hamster<br>weniger infektiös für Hase, Katze, Ziege und Rind |
| <i>M.bovis</i>        | Rind, Mensch, Nager, Hund, Katze, Schwein, Papagei<br>der attenuierte Stamm BCG dient als Impfstoff    |
| <i>M.microti</i>      | Wühlmaus, Meerschweinchen, Hase<br>für Menschen in der Regel nicht infektiös                           |
| <i>M.africanum</i>    | Meerschweinchen, Maus, Hase<br>nur wenige Infektionen beim Menschen bekannt                            |

Die typischen Symptome einer Tuberkulose umfassen ein allgemeines Unwohlsein, Mattigkeit, Blässe, Appetitlosigkeit, allmählichen Gewichtsverlust, Schmerzen im Brustbereich und den typischen tiefsitzenden Tuberkulose-Husten, der bei fortgeschrittener Krankheit zunehmend von blutigem Auswurf begleitet ist. Desweiteren tritt am späten Nachmittag eine erhöhte Körpertemperatur auf, die sich dann während der Nacht in Form von Schweißausbrüchen fortsetzt. Es sei an dieser Stelle nur angemerkt, daß es auch andere Formen der Tb gibt, die sich nicht in der Lunge manifestieren oder sich von der Lunge ausgehend in andere Organe ausbreiten.

Der zweite bekannte Erreger der Mykobakterien ist *M.leprae*, der Verursacher der Lepra. Dieses nicht-kultivierbare Bakterium ist lediglich in infektiöser Form in Gürteltieren zu züchten. *M.leprae* dringt nicht tief in Körpergewebe ein und befällt beim Menschen die Haut, die Geschlechtsteile oder periphere Nervengewebe.

Weniger bekannte pathogene Mykobakterien umfassen zum Beispiel den MAIS Complex. Dessen Vertreter, *M.avium*, *M.intracellulare* und *M.scrofulaceum*, rufen eine bronchialere Form der Tb hervor, verursachen aber auch häufig eine Lymphadenitis. Oft treten diese Infektionen im Zusammenhang mit HIV auf.

Weitere Erreger sind die meist auf Fische, Amphibien und Reptilien beschränkten Stämme *M.fortuitum* und *M.chelonae*, die, genauso wie *M.haemophilum*, *M.marinum* und *M.ulcerus* (auch *M.ulcerans*), lediglich kutane, relativ leicht zu behandelnde Infektionen verursachen.

Die meisten der nicht-pathogenen Vertreter der Mykobakterien sind im Vergleich zu den pathogenen Stämmen schnell-wachsende Organismen. *M.smegmatis*, ein Bakterium, das im Boden und im Wasser vorkommt, ist deshalb bekannt, weil in ihm die Grundlagen für genetische Arbeiten in Mykobakterien geschaffen worden sind (Snapper *et al.*, 1988; Snapper *et al.*, 1990; Garbe *et al.*, 1993; Falcone *et al.*, 1995; Garbe *et al.*, 1994). Ein anderer Stamm, *M.vaccae*, wird als Kandidat für eine Immuntherapie gegen Tuberkulose gehandelt (Stanford & Stanford, 1994; Onyebujoh *et al.*, 1995; Stanford & Stanford, 1995).

### 1.3 Antigene im allgemeinen und speziellen

Seitdem in den vergangenen etwa gut 10 Jahren das experimentelle Wissen dafür geschaffen worden ist, wurden eine Reihe mykobakterieller Antigene kloniert und charakterisiert. Die bekanntesten darunter sind Hitzeschockproteine, über die inzwischen vergleichsweise viel bekannt ist (Thole & van der Zee, 1990; Young *et al.*, 1992; Hughes, 1993; del Giudice, 1994; Little *et al.*, 1994; Lowrie *et al.*, 1994; Oftung *et al.*, 1994; Roman *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1994; Silva & Lowrie, 1994; Launois *et al.*, 1995). Wegen ihrer hoch konservierten Sequenz und der universellen Verbreitung ist ihr Einsatz für Diagnoseverfahren zwar schwierig, mittels PCR-Methoden aber möglich (Steingrube *et al.*, 1995). Vielversprechende Resultate sind auch bei Immunisierungen mit Hsp-produzierenden Systemen zu verzeichnen (Silva & Lowrie, 1994; Lowrie *et al.*, 1996).

Das Hauptaugenmerk liegt aber auf tuberkulose-spezifischen Antigenen. Besonders solche, die bereits nach kurzzeitigem Wachstum im extrazellulären Raum zu finden sind, scheinen vielversprechend, da sie dem Immunsystem die ersten Angriffspunkte

bieten (Andersen *et al.*, 1991; Harboe, 1992; Verbon *et al.*, 1992; Orme *et al.*, 1993; Andersen, 1994; Roche *et al.*, 1994; Boesen *et al.*, 1995; Haslov *et al.*, 1995; Horwitz *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1995). Ein Gemisch solcher Proteine sollte im Idealfall nach Injektion einen optimalen Schutz vor einer Infektion bieten. Das Ziel ist deshalb die Suche nach dem richtigen Antigengemisch und der optimalen Darreichungsform für ein solches *subunit vaccine*.

Eines der extensiv untersuchten Antigene ist das 38 kD-Antigen von *M.tuberculosis*, ein Glyko- und Lipoprotein, das am Phosphattransport durch die Zellmembran beteiligt ist (Espitia *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1994; Dissertation Damaschke, 1996). Es zeigt 30% Homologie zum Phosphat-bindenden Protein PstS aus *Escherichia coli* (Andersen & Hansen, 1989). Dieses Antigen wurde in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Singh *et al.*, 1992), und inzwischen auch kristallisiert (Choudhary *et al.*, 1994). Seine immunologische Charakterisierung ist sehr weit fortgeschritten (Young *et al.*, 1986; Kadival *et al.*, 1987; Bothamley & Rudd, 1994; d'Souza *et al.*, 1994; Vordermeier *et al.*, 1994; Pollock *et al.*, 1995; Vordermeier *et al.*, 1995b). Es scheint sowohl in der Serologie, als auch in Schutzexperimenten, ein erhebliches Potential zu besitzen (Vordermeier *et al.*, 1995a; Wilkinson *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1996).

Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen von *M.tuberculosis* stellt ebenfalls ein Protein dar, das sehr früh während des Wachstums von der Zelle ausgeschieden wird. 1988 wurde ein monoklonaler Antikörper mit der Bezeichnung HBT-10 isoliert (Worsaae *et al.*, 1988). Dieser mAb zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, zwar mit dem Erreger *M.tuberculosis*, aber nicht mit dem Impfstamm *M.bovis* BCG zu reagieren, eine Eigenschaft, die bislang noch nie beobachtet worden war (Ljungqvist *et al.*, 1988). Außer mit *M.tuberculosis* konnte jedoch auch eine Reaktion mit Zellextrakten von *M.marinum* beobachtet werden.

Der Versuch, das Protein mittels des an Sepharose gekoppelten mAb HBT-10 aufzureinigen, war gescheitert (Ljungqvist *et al.*, 1990). Die Autoren führen dies auf die wahrscheinlich komplexe Quartärstruktur des hexameren Proteins zurück.

Kurz darauf wurden aus einer  $\lambda$ gt11-Bank drei Klone isoliert, die allesamt mit dem mAb HBT-10 reagieren (Andersen et al., 1988). Die antigene Determinante dieser drei Klone bekam zunächst die Bezeichnung *pac* (protein antigen c). Es sollte sich herausstellen, daß zwei dieser drei Klone das vollständige ORF des mit HBT-10 reagierenden Proteins enthalten.

Die Charakterisierung dieser Klone erfolgte einige Jahre später durch die gleiche Gruppe (Andersen et al., 1992). In dieser Arbeit wurde die DNA-Sequenz einer der vollständigen Klone bestimmt. Die abgeleitete Primärsequenz des Proteins zeigt auf Aminosäureebene über 50% Identität zu zwei Proteinen aus *Bacillus sphaericus* (Ohshima et al., 1990) und *Bacillus stearothermophilus* (Sakamoto et al., 1990). Aufgrund dessen wurde die funktionelle Identität des 40 kD-Antigens als L-Alanin Dehydrogenase (E.C. 1.4.1.1) postuliert, was sich in biochemischen Untersuchungen bestätigen sollte. Die Begriffe *40 kD-Antigen* und *Alanin Dehydrogenase* werden in dieser Arbeit als Synonyme benutzt.

Aus nativen Gelen wurde bestimmt, daß das 40 kD-Antigen ein hexameres Protein ist (Andersen et al., 1992). Seine Untereinheiten besitzen ein abgeleitetes Molekulargewicht von 38.988 Dalton. Das funktionelle Enzym hat demnach ein Molekulargewicht von nicht weniger als 234 kD. Es katalysiert die reversible Reaktion :

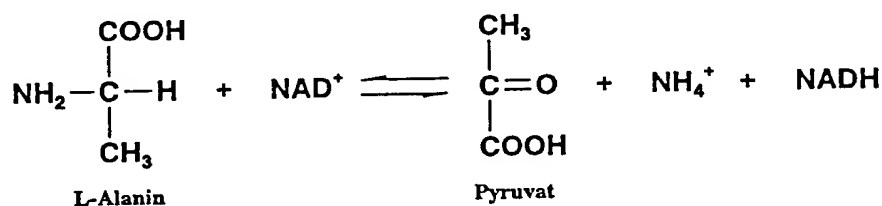


Abb. 1.1 : L-Alanin Dehydrogenase (E.C. 1.4.1.1)

Trotz des Fehlens einer Signalsequenz ist das Protein *in vivo* in *M.tuberculosis* fast ausschließlich extrazellulär zu finden. Bereits nach 4 Tagen ist es in großen Mengen im Kulturmedium nachzuweisen. Es wurde deshalb schon viel über seine physiologische Funktion spekuliert. Eine Rolle des Enzyms bei der Zellwandsynthese ist hierbei der

Konsens aller Spekulationen. Für diese Annahme gab es bislang jedoch keine konkreten Hinweise.

Diese Funktion einer AlaDH ist bisher auch noch nicht beschrieben worden. Die bis zum heutigen Zeitpunkt charakterisierten AlaDH's haben zum Großteil ihre Aufgabe bei der Ammonium-Assimilation (Caballero *et al.*, 1989; Flores & Sanchez, 1989), beim Alanin-Katabolismus (Crow, 1987) oder bei beidem (Tolxdorff-Neutzling & Klemme, 1982; Bellion & Tan, 1987; Sakamoto *et al.*, 1990). Desweiteren wird eine AlaDH für eine normal ablaufende Sporulation bei *Bacillus subtilis* benötigt (Nitta *et al.*, 1974; Siranosian *et al.*, 1993). Auch in diesem Fall dient das Enzym als Ausgangspunkt für die Energieversorgung der Zelle. Energie entsteht dabei direkt in Form des Endprodukts NADH und indirekt über Pyruvat, das in den Zitronensäurezyklus eingeschleust wird. Dabei entsteht ebenfalls Energie in Form von NADH. Auch für die Synthese einiger Sekundärmetabolite, zum Beispiel diverser Antibiotika, wird eine AlaDH benötigt (Flores & Sanchez, 1989; Vancura *et al.*, 1989).

#### 1.4 Das Konzept der Virulenz

Das Konzept der Virulenz des Tuberkulose-Erregers ist noch ein Buch mit sieben Siegeln. Zwar werden nach und nach Teile dieses Rätsels gelöst, ohne daß dies jedoch bis jetzt ein zusammenhängendes Bild ergibt. Was die generelle Strategie des Erregers betrifft, so paßt sie wohl bei Anwendung der Klassifikation von Mekananos am ehesten in die Kategorie "*no harm, no foul*" (Mekananos, 1992). Diese Allegorie aus dem Basketball läßt sich wohl am besten mit "tust du mir nichts, tue ich dir auch nichts" übersetzen. Der pathogene Organismus kann sich zwar im Wirt manifestieren, schädigt ihn aber nicht. Bei einem immunkompetenten Wirtsorganismus kann sich dieses Spiel ein ganzes Leben lang hinziehen, wie es bei der Tuberkulose auch oft der Fall ist. Erst wenn der Regulationskreis, der diesen Zustand aufrecht hält, aus dem Gleichgewicht gerät, fängt der Kampf zwischen dem Erreger und dem Wirt an. Dies ist dann in der Regel der Ausbruch einer Tb. Nur in den seltensten Fällen gelingt es dem

menschlichen Körper den Eindringling zu eliminieren. Das Charakteristikum der "no harm, no foul" Strategie liegt in einer im Vergleich zur Erkrankungsrate sehr hohen Infektionsrate. Dieses Merkmal trifft auf die Tb vollständig zu. Es wird davon ausgegangen, daß etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M.tuberculosis* infiziert ist. Aber nur bei circa 10% der Infizierten tritt irgendwann in deren Leben das Krankheitsbild auf (Kochi, 1991; Bloom & Murray, 1992).

Während bei anderen pathogenen Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Salmonella typhimurium* (Fields *et al.*, 1986; Buchmeier & Heffron, 1989; Fields *et al.*, 1989; Buchmeier & Heffron, 1990; Galán & Curtiss, 1990; Miller *et al.*, 1991; Buchmeier *et al.*, 1993; Bowe & Heffron, 1994; Buchmeier *et al.*, 1995; Wick *et al.*, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (di Rita & Mekalanos, 1989; Storey *et al.*, 1990; di Rita & Mekalanos, 1991; Passador *et al.*, 1993), *Legionella pneumophila* (Black *et al.*, 1990) oder *Listeria monocytogenes* (Sokolovic & Goebel, 1989; Leimeister-Wachter *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1996), sehr viel über Virulenzfaktoren und ihre Regulation bekannt ist, ist das Wissen bei *M.tuberculosis* eher spärlich. Zwar wird zur Zeit intensiv nach solchen Faktoren gesucht (North & Izzo, 1993; Mundayoor & Shinnick, 1994; Pascopella *et al.*, 1994; Pedrosa *et al.*, 1994; Plum & Clark-Curtiss, 1994; Ramakrishnan & Falkow, 1994; McDonough & Kress, 1995; Ordway *et al.*, 1995; Sarmiento & Appelberg, 1995; Shinnick *et al.*, 1995), doch meist enden diese Versuche mehr in der Beschreibung des Bildes der Virulenz, als daß sie konkrete Anhaltspunkte liefern.

Als bekannt gilt bisher, daß Alkohol die Expression von mit Virulenz assoziierten Proteinen erhöht (Bermudez *et al.*, 1993). Diese Tatsache könnte ein Mechanismus sein, wie der stillschweigend erklärte Waffenstillstand zwischen dem Erreger und dem Wirt gestört werden kann. Als möglicher Virulenzfaktor direkt wurde Lipoarabinomannan, ein für Mykobakterien spezifischer Bestandteil der Zellwand, vorgeschlagen (Chan *et al.*, 1991). Dieser Zucker unterscheidet sich bei den virulenten Stämmen von *M.tuberculosis* von dem der avirulenten Stämme (Chatterjee *et al.*, 1992; Arya *et al.*, 1993; Leopold & Fischer, 1993; Prinzis *et al.*, 1993; Roach *et al.*, 1993; Anthony *et al.*, 1994; Lemassu & Daffe, 1994). Desweiteren wurden einem Protein mit



Homologie zu Virulenz-regulierenden Proteinen anderer pathogener Bakterien (Gupta & Tyagi, 1993) und einem Protein, das bei heterologer Expression in *E.coli* hämolytische Eigenschaften zeigt (Leão *et al.*, 1995), die Rollen von Virulenzfaktoren zugeschrieben. Letzteres Protein zeigt Homologien zur Phospholipase C, einem Enzym, das, genauso wie die Phospholipase D, bei der Virulenz von *Clostridium perfringens* (Kamayama *et al.*, 1974; Smith, 1979), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Hodgson *et al.*, 1992; McNamara *et al.*, 1994), *Listeria monocytogenes* (Camilli *et al.*, 1991; Raveneau *et al.*, 1992) und *Pseudomonas aeruginosa* (Ostroff *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1995) eine wichtige Rolle spielt. Bei Mykobakterien wurde Phospholipase C - Aktivität ausschließlich bei virulenten Stämmen gefunden, wohingegen Phospholipase D - Aktivität bei allen untersuchten Stämmen zu finden war (Johansen *et al.*, 1996).

Auch für das 40 kD-Antigen wurde der Verdacht geäußert, es könnte einen Virulenzfaktor darstellen (Delforge *et al.*, 1993). Diese Vermutung geht auf die Beobachtung zurück, daß die NAD(H)-Bindungsstellen der AlaDH von *M.tuberculosis* und den Pyridinnukleotid-Transhydrogenasen (PNT) von *E.coli* und von Rinder Mitochondrien dasselbe Konsensusmotiv besitzen (GxGxxG(17x)D-Motiv). Da auf Western Blots von Extrakten des Tb-Erregers mit dem mAb HBT-10 zudem, außer der AlaDH-Bande, eine weitere Bande in der Höhe des Molekulargewichts der PNT auftaucht, wurde spekuliert, daß der Antikörper an der NAD(H)-Bindungsstelle sein Epitop besitzt. Das 40 kD-Antigen würde in diesem Fall seine virulente Komponente dann darin besitzen, daß es die kritische Balance zwischen NADH und NADPH dereguliert. Das Bakterium benötigt selbst große Mengen an NADPH für anabole Zwecke, vor allem für die Aminosäurebiosynthese. Genau darin liegt die physiologische Aufgabe der PNT. Das bei katabolen Reaktionen entstehende NADH wird hierbei als treibende Kraft verwendet (Abb. 1.2; Bragg *et al.*, 1972; Jackson, 1991).



Abb.1.2 : Pyridinnukleotid-Transhydrogenase (E.C 1.6.1.1)

### 1.5 Aufgabenstellung

Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen stellt in vielerlei Hinsicht ein interessantes Objekt für eingehende Studien dar.

Das Antigen war bereits in einen Expressionsvektor für *Escherichia coli* kloniert worden (Konrad & Singh, unveröffentlicht). Es sollte deshalb die Expression und die Aufreinigung des rekombinanten Proteins optimiert werden. Mit einer homogenen Proteinfraction sollten dann die entscheidenden biochemischen Parameter des Enzyms bestimmt werden. Aus solchen Daten lassen sich erfahrungsgemäß Rückschlüsse auf die physiologische Funktion eines Enzyms ziehen. Es stellte sich hierbei die Frage, ob die hypothetische Aufgabe des Enzyms bei der Zellwandbiosynthese unterstrichen oder widerlegt werden kann. Im Falle einer Widerlegung sollten andere mögliche Funktionen eruiert werden.

Zudem können sich aus der Biochemie Ansatzpunkte für eine gezielte Beeinflussung des Enzyms *in vivo* ergeben. In diesem Zusammenhang ist erneut die physiologische Funktion der Schlüsselpunkt aller Anstrengungen. Wenn das Antigen für das Bakterium eine essentielle Rolle spielen sollte, dann könnten sich durch gezielte Versuche das Gen oder das Protein auszuschalten Möglichkeiten ergeben, den Tuberkulose-Erreger an einem definierten Punkt am Wachstum zu hindern. Das Protein wäre dann ideales *drug target*. Sollte das 40 kD-Antigen zudem, wie postuliert (Delforge *et al.*, 1993), einen Virulenzfaktor darstellen, dann könnte durch solche Unternehmungen Einfluß auf die natürliche Virulenz des Bakteriums genommen werden. Durch verschiedene Ansätze sollte deshalb auch dieser Punkt überprüft werden.

Die Möglichkeit, mittels des mAb HBT-10 die Stämme *M.tuberculosis* und *M.bovis* BCG zu diskriminieren, ermöglicht es Verfahren zu entwickeln, die eine Infektion von einer Impfung unterscheiden können. Dies ist mit den gebräuchlichen Screeningverfahren, dem PPD- oder dem Mantoux-Test, nicht möglich (Bass Jr. *et al.*, 1990; Huebner *et al.*, 1993). Durch die Analyse der Verbreitung des Gens bzw. des Genprodukts sollte die Grundlage dafür geschaffen werden, eine rationelle Verfahrensentwicklung für einen solchen Test zu ermöglichen. Zudem sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein eines funktionellen Enzyms mit irgendwelchen anderen Parametern korreliert. Insbesondere auf taxonomische und virulente Zusammenhänge wurde hierbei Wert gelegt. Auch bestimmte natürliche Lebensweisen oder der Eintritt in bestimmte Wachstumsphasen könnten mit der Alanin Dehydrogenase in Zusammenhang stehen. Diesen Fragen sollte auf den Grund gegangen werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Lebendes Material

#### 2.1.1 Bakterien

##### 2.1.1.1 *E.coli* Stämme

Der Stamm *Escherichia coli* wurde verwendet um die Expression des rekombinanten 40 kD-Antigens zu optimieren (Tab. 2.1). Zudem wurden in ihm bereits klonierte mykobakterielle Antigene überproduziert (Tab. 2.2).

Tab. 2.1 : Benutzte Expressionsstämme und deren relevante Eigenschaften

| Stamm                      | Genotyp und relevanter Phänotyp  | Herkunft / Referenz            |
|----------------------------|--|--------------------------------|
| <i>E.coli</i> CAG 629      | <i>lac(am) pho(am) trp(am) supC<sup>ts</sup> rpsL mal(am) lon</i><br><i>htpR165-Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i>  | C.Gross                        |
| <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169(<math>\phi</math>80 <i>lacZ</i> <math>\Delta</math>M15) <i>hsdR17 recA1</i><br/><i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>   | Hanahan (1983)                 |
| <i>E.coli</i> TG2          | <i>supE <i>hsd</i><math>\Delta</math>5 <i>thi</i><math>\Delta</math>(<i>lac-proAB</i>) <math>\Delta</math>(<i>srl-recA</i>)306::Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i><br><i>F'(traD36 proA<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZM15)</i> | Sambrook <i>et al.</i> (1989)  |
| <i>E.coli</i> SURE         | <i>hsdR mcrA mcrB mvr endA supE44 thi-1 <math>\lambda</math>- gyrA96</i><br><i>relA1 lac recB recJ sbcC umuC uvrC (F'<i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i></i><br><i><math>\Delta</math>M15 Tn10(Tet<sup>R</sup>))</i>          | Stratagene                     |
| <i>E.coli</i> BL 321       | <i>rnc105 nadB<sup>+</sup> purI<sup>+</sup></i>  | Studier (1975)                 |
| <i>E.coli</i> N 4830       | <i>su<sup>o</sup> his ilv galK<math>\Delta</math>8 <math>\Delta</math>chlD-pgl (<math>\lambda</math> <math>\Delta</math>Bam N<sup>+</sup> cl<sub>ts857</sub> <math>\Delta</math>Hl)</i>                                  | Gottesman <i>et al.</i> (1980) |
| <i>E.coli</i> 538          | Genotyp unbekannt  | Bayer AG                       |

Tab. 2.2 (1/2) : Produzenten mykobakterieller Antigene und deren Charakteristika

Es ist angegeben, welches Antigen von den jeweiligen Stämmen produziert wird. Die beiden letzten Spalten geben die Anzuchtbedingungen wieder (siehe auch 2.5.2).

| Stamm                                  | Herkunft / Referenz(en)  | Produkt                                     | Antibiotika | Induktion |
|--|--|---|-------------|-----------|
| <i>E.coli</i> BL21 (pKAM1301)          | J. van Embden  | GST-36 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>       | Ap          | IPTG      |
| <i>E.coli</i> BL21/plys5<br>(pKAM3601) | J. van Embden  | 70 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>           | Ap + Cm     | IPTG      |
| <i>E.coli</i> CAG629 (pMS9-2)          | Singh <i>et al.</i> (1992)   | 38 kD-Antigen,<br><i>M.tuberculosis</i>     | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> CAG629 (pMS14-1)         | Cherayil & Young (1988)<br>Dale & Patki (1990)<br>Singh <i>et al.</i> (unveröff.)        | 28 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>           | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> M15 (pHISK16<br>+ pREP4) | Verbon <i>et al.</i> (1992)<br>Vordermeier <i>et al.</i> (1993)                          | 16 kD-Antigen,<br><i>M.tuberculosis</i>     | Ap          | IPTG      |
| <i>E.coli</i> M1697                    | V. Mehra   | His-30 kD-Antigen,<br><i>M.tuberculosis</i> | Ap + Km     | IPTG      |
| <i>E.coli</i> M1698                    | V. Mehra   | His-30 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>       | Ap + Km     | IPTG      |
| <i>E.coli</i> POP (pKAM2101)           | J. van Embden  | 70 kD-Antigen,<br><i>M.tuberculosis</i>     | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> POP (pRIB1300)           | Thole <i>et al.</i> (1987)<br>van Eden <i>et al.</i> (1988)                              | 65 kD-Antigen,<br><i>M.bovis</i> BCG        | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> POP (pZW1003)            | Mehra <i>et al.</i> (1986)<br>van der Zee <i>et al.</i> (unveröff.)                      | 65 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>           | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> TB1 (pKAM1101)           | di Guan <i>et al.</i> (1987)<br>Maina <i>et al.</i> (1988)<br>Thole <i>et al.</i> (1990) | MBP-36 kD-Antigen,<br><i>M.leprae</i>       | Ap          | Hitze     |

Tab. 2.2 (2/2) : Produzenten mykobakterieller Antigene und deren Charakteristika

Es ist angegeben, welches Antigen von den jeweiligen Stämmen produziert wird. Die beiden letzten Spalten geben die Anzuchtbedingungen wieder (siehe auch 2.5.2).

| Stamm                               | Herkunft / Referenz(en)   | Produkt                                      | Antibiotika | Induktion |
|-------------------------------------|---|--|-------------|-----------|
| <i>E.coli</i> TB1 (pKAM4101)        | J. van Embden   | MBP-2nd 65 kD-Antigen, <i>M.leprae</i>       | Ap          | Hitze     |
| <i>E.coli</i> TB21-8/2              | Khanolar-Young <i>et al.</i> (1992)<br>Mehra <i>et al.</i> (1992) | MBP-10 kD-Antigen, <i>M.tuberculosis</i>     | Ap          | IPTG      |
| <i>E.coli</i> TG2 - 50/55 Sal large | C.Espitia; M.Singh  | 50/55 kD, large frag., <i>M.tuberculosis</i> | Ap          | IPTG      |

### 2.1.1.2 Mykobakterielle Stämme

Tab. 2.3 (1/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

| Stamm                 | Abkürzung | Genaue Bezeichnung, Herkunft                         |
|-----------------------|-----------|--|
| <i>M.africanum</i> 1  | Afr1      | <i>M.africanum</i> nr.5544, RIV                      |
| <i>M.asiaticum</i> 1  | Asi1      | <i>M.asiaticum</i> 3250, Portaals                    |
| <i>M.avium</i> 1      | Avi1      | <i>M.avium</i> Myc 3875, Serotype 2, RIV             |
| <i>M.bovis</i> 3      | Bov3      | <i>M.bovis</i> nr.8316, RIV                          |
| <i>M.bovis</i> BCG 2  | BCG2      | <i>M.bovis</i> Copenhagen, Serumsinstitut Copenhagen |
| <i>M.bovis</i> BCG 4  | BCG4      | <i>M.bovis</i> BCG P <sub>3</sub> , RIV              |
| <i>M.chelonae</i> 7   | Che7      | <i>M.chelonei</i> 1490, P.Dirven                     |
| <i>M.flavescens</i> 1 | Fla1      | <i>M.flavescens</i> ATCC 14474, RIV                  |
| <i>M.fortuitum</i> 11 | For11     | <i>M.fortuitum</i> ATCC 6841, RIV                    |
| <i>M.gastri</i> 1     | Gas1      | <i>M.gastri</i> ATCC 25220, RIV                      |
| <i>M.gordonae</i> 3   | Gor3      | <i>M.gordonae</i> 8960, Portaals                     |

Tab. 2.3 (2/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

| Stamm                                   | Abkürzung         | Genaue Bezeichnung, Herkunft  |
|---|-------------------|---|
| <i>M.intracellulare</i> 1               | Int1              | <i>M.intracellulare</i> 6997, ATCC 15985, Portaals                  |
| <i>M.intracellulare</i> 5               | Int5              | <i>M.intracellulare</i> IWG MT3, RIV                                |
| <i>M.kansasii</i> 1                     | Kan1              | <i>M.kansasii</i> Myc 1012, RIV                                     |
| <i>M.lufu</i> 1                         | Luf1              | <i>M.lufu</i> 219, RIV  |
| <i>M.marinum</i> 3                      | Mar3              | <i>M.marinum</i> L66, Portaals                                      |
| <i>M.microti</i> 1                      | Mic1              | <i>M.microti</i> nr.1278, Portaals                                  |
| <i>M.nonchromogenium</i> 1              | Non1              | <i>M.nonchromogenium</i> ATCC 25145, RIV                            |
| <i>M.parafortuitum</i> 1                | Paf1              | <i>M.parafortuitum</i> nr.6999, Portaals                            |
| <i>M.peregrinum</i> 1                   | Per1              | <i>M.peregrinum</i> , Patient Bakker, TB6849,<br>Antonie Ziekenhuis |
| <i>M.phlei</i> 1                        | Phl1              | <i>M.phlei</i> 258 (Ph), Portaals                                   |
| <i>M.phlei</i> 4                        | Phl4              | <i>M.phlei</i> Weybridge R82, Tony Eger                             |
| <i>M.scrofulaceum</i> 1                 | Scr1              | <i>M.scrofulaceum</i> Myc 3442, RIV                                 |
| <i>M.scrofulaceum</i> 8                 | Scr8              | <i>M.scrofulaceum</i> Myc 6672, RIV                                 |
| <i>M.simiae</i> 1                       | Sim1              | <i>M.simiae</i> 784, Tony Eger                                      |
| <i>M.smegmatis</i> 1                    | Sme1              | <i>M.smegmatis</i> ATCC 14460, RIV                                  |
| <i>M.smegmatis</i> 3                    | Sme3              | <i>M.smegmatis</i> 8070, Portaals                                   |
| <i>M.terrae</i> 2                       | Ter2              | <i>M.terrae</i> , RIV   |
| <i>M.thermoresistibile</i> 1            | The1              | <i>M.thermoresistibile</i> nr.7001, Portaals                        |
| <i>M.triviale</i> 1                     | Tri1              | <i>M.triviale</i> 8067, Portaals                                    |
| <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>v</sub> | H37R <sub>v</sub> | <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>v</sub> , RIV                       |
| <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>a</sub> | H37R <sub>a</sub> | <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>a</sub> , nr.19629, RIV             |
| <i>M.tuberculosis</i> 1                 | Tub1              | <i>M.tuberculosis</i> 4514, RIV                                     |
| <i>M.tuberculosis</i> 49                | Tub49             | <i>M.tuberculosis</i> C <sub>3</sub> , Sang-Hae Cho, Südkorea       |
| <i>M.tuberculosis</i> 60                | Tub60             | <i>M.tuberculosis</i> S <sub>2</sub> , Sang-Hae Cho, Südkorea       |

Tab. 2.3 (3/3) : Benutzte Mykobakterien und deren Herkunft

| Stamm                     | Abkürzung | Genaue Bezeichnung, Herkunft   |
|---------------------------|-----------|--|
| <i>M.tuberculosis</i> 118 | Tub118    | <i>M.tuberculosis</i> Myc 16293, Hannoufi  |
| <i>M.tuberculosis</i> 130 | Tub130    | <i>M.tuberculosis</i> , patient yy, Strichcode 3.1265, Dr.Bijlmer, Den Haag  |
| <i>M.tuberculosis</i> 132 | Tub132    | <i>M.tuberculosis</i> Myc 16770, RIV   |
| <i>M.tuberculosis</i> 145 | Tub145    | <i>M.tuberculosis</i> 416138N, Patient N.Wielaart, Reg.Nr. 7.796.267, WKZ, Utrecht   |
| <i>M.tuberculosis</i> 146 | Tub146    | <i>M.tuberculosis</i> , Abdi Hussein   |
| <i>M.tuberculosis</i> 163 | Tub163    | <i>M.tuberculosis</i> 925, Patientenisolat Nr. 32, INH <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> , Rif <sup>s</sup> , Eth <sup>s</sup> |
| <i>M.ulcerus</i> 1        | Ulc1      | <i>M.ulcerus</i> 932, Portaals   |
| <i>M.vaccae</i> 3         | Vac3      | <i>M.vaccae</i> ATCC 25950, RIV  |
| <i>M.xenopi</i> 7         | Xen7      | <i>M.xenopi</i> code 132, Patient Alois Necas, H.Kristanpul, Prag  |

### 2.1.1.3 Andere Bakterienstämme

Tab. 2.4 : Weitere benutzte Bakterienstämme

| Stamm                             | Herkunft       |
|-----------------------------------|----------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> EGB | Andreas Lignau |
| <i>Listeria innocua</i>           | Andreas Lignau |
| <i>Nocardia asteroides</i> 702774 | Juul Bruins    |
| <i>Rodococcus equi</i> nr.10P388  | VMDC, Utrecht  |



## 2.1.2 Zellkultur

Benutzt wurde die Mäuse Makrophagen Zelllinie J774. Diese Zelllinie war ursprünglich aus einem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus etabliert worden (Ralph & Nakoinz, 1975). J774 wird für Phagozytose-Assays, zur Produktion von IL-1 und für vielfältige biochemische Untersuchungen benutzt. Sie besitzt Rezeptoren für Immunglobuline und Komplement. Desweiteren produziert J774 Lysozym in großen Mengen und sekretiert IL-1 konstitutiv (Ralph & Nakoinz, 1976; Snyderman *et al.*, 1977). Die Aufnahme von Bakterien erfolgt durch Phagozytose. Direkte Zytolyse von Fremdorganismen ist relativ selten.

## 2.2 Nukleinsäuren

### 2.2.1 Plasmide

#### pJLA604Not

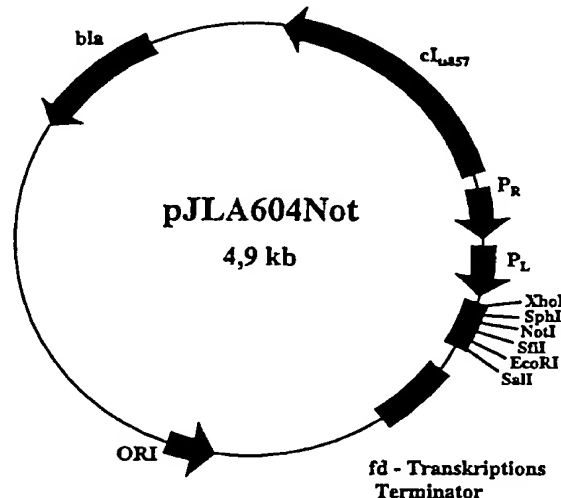


Abb. 2.1 : Das Plasmid pJLA604Not und seine relevanten funktionellen Abschnitte

Dieses 4,9 kb große Plasmid, ein Derivat von pJLA 604 (Schauder *et al.*, 1987), wurde als Expressionsvektor verwendet (Abb. 2.1). Das Plasmid pJLA604Not (Konrad & Singh, unveröffentlicht) unterscheidet sich von pJLA604 dadurch, daß die *NdeI*-

Schnittstelle entfernt, und statt dessen eine *NotI*-Schnittstelle eingebaut wurde. Das Leseraster der Translation beginnt mit dem ATG-Codon der *SphI*-Schnittstelle. Die Transkription startet an den Lambda-Promotoren  $P_R$  und  $P_L$ , wird jedoch bei Temperaturen von 28-30°C durch das  $cl_{I_{857}}$ -Genprodukt effektiv reprimiert. Induktion wird durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C erreicht. Bei dieser Temperatur wird der temperatursensible Lambda-Repressor inaktiv und kann die Transkription nicht mehr reprimieren. Die Transkription endet am *fd*-Terminator. Zudem besitzt der Vektor die *atpE* Translations-Initiationsregion (TIR) von *E.coli*. Dieser Abschnitt ist sehr nützlich für die Initiation der Translation, da er nur wenig störende Sekundärstrukturen besitzt und dadurch eine hohe Expressionsrate gewährleistet (McCarthy *et al.*, 1986). Als Selektionsmarker verfügt das Plasmid über das  $\beta$ -Lactamase-Gen, das für eine Ampicillinresistenz codiert.

Als negatives Kontrollplasmid wurde auch pJLA603 verwendet, das bis auf wenige Basen in der Klonierungsstelle mit pJLA604 identisch ist.

### pMSK12

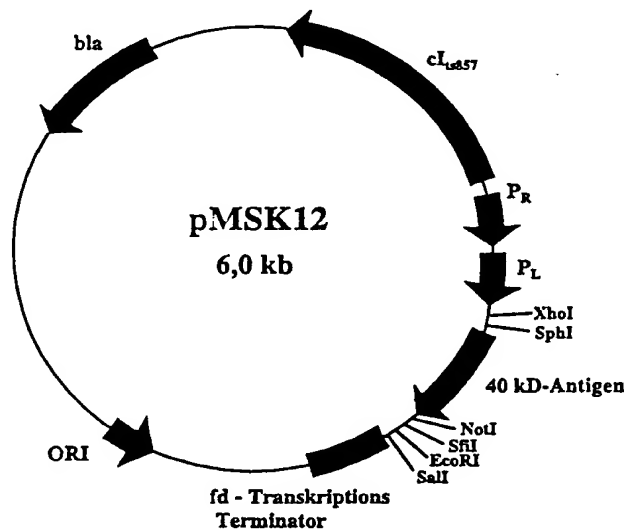


Abb. 2.2 : Das Plasmid pMSK12 und seine relevanten funktionellen Abschnitte

Dies ist ein Derivat des Plasmids pJLA604Not, bei dem zwischen die *SphI*- und die *NotI*-Schnittstelle das 40kD-Antigen von *Mycobacterium tuberculosis* kloniert wurde (Abb. 2.2; Konrad & Singh, unveröffentlicht).

### 2.2.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide (Tab. 2.5) wurden von Frau Astrid Hans (GBF, Braunschweig) an einem 394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems) hergestellt. Gereinigt wurden die Oligonukleotide mit einer Oligonucleotide Purification Cartridge (Applied Biosystems).

Tab. 2.5 : Verwendete Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz                         | Orientierung |
|-------------|---------------------------------|--------------|
| AlaDH-F1    | 5'-ATGCGCGTCGGTATTCCG-3'        | forward      |
| AlaDH-F1+   | 5'-GCGCGTCGGTATTCCGACCG-3'      | forward      |
| AlaDH-F2    | 5'-GAGACCAAAAACAACGAA-3'        | forward      |
| AlaDH-F4    | 5'-GAATTC CATCAGCAATCTTGCAGA-3' | forward      |
| AlaDH-F5    | 5'-GCCCCGATGAGCGAAGTC-3'        | forward      |
| AlaDH-F6    | 5'-GGGGCCGTCCTGGTGCC-3'         | forward      |
| AlaDH-F7    | 5'-GACGTCGACCTACGCGCTGAC-3'     | forward      |
| AlaDH-R1    | 5'-CTCGGTGAACGGCACCCC-3'        | reverse      |
| AlaDH-R2    | 5'-GGCCAGCACGCTGGCGGG-3'        | reverse      |
| AlaDH-R3    | 5'-CACCCGTTCCGGACAGTAA-3'       | reverse      |
| AlaDH-R4    | 5'-CGCGGCCGACATCATCGC-3'        | reverse      |
| AlaDH-R5    | 5'-GGCCGACATCATCGCTTCCC-3'      | reverse      |
| AlaDH-R6    | 5'-CGAGACTAATTTGGGTGCCTTGGC-3'  | reverse      |
| AlaDH-R7    | 5'-ATTTGGGTGCCTTGGC-3'          | reverse      |
| AlaDH-RM    | 5'-GGCGGCGAGTCGACCGGC-3'        | reverse      |

Die Lokalisation der Oligos auf dem *AlaDH*-Gen ist in Abb. 2.3 schematisiert.

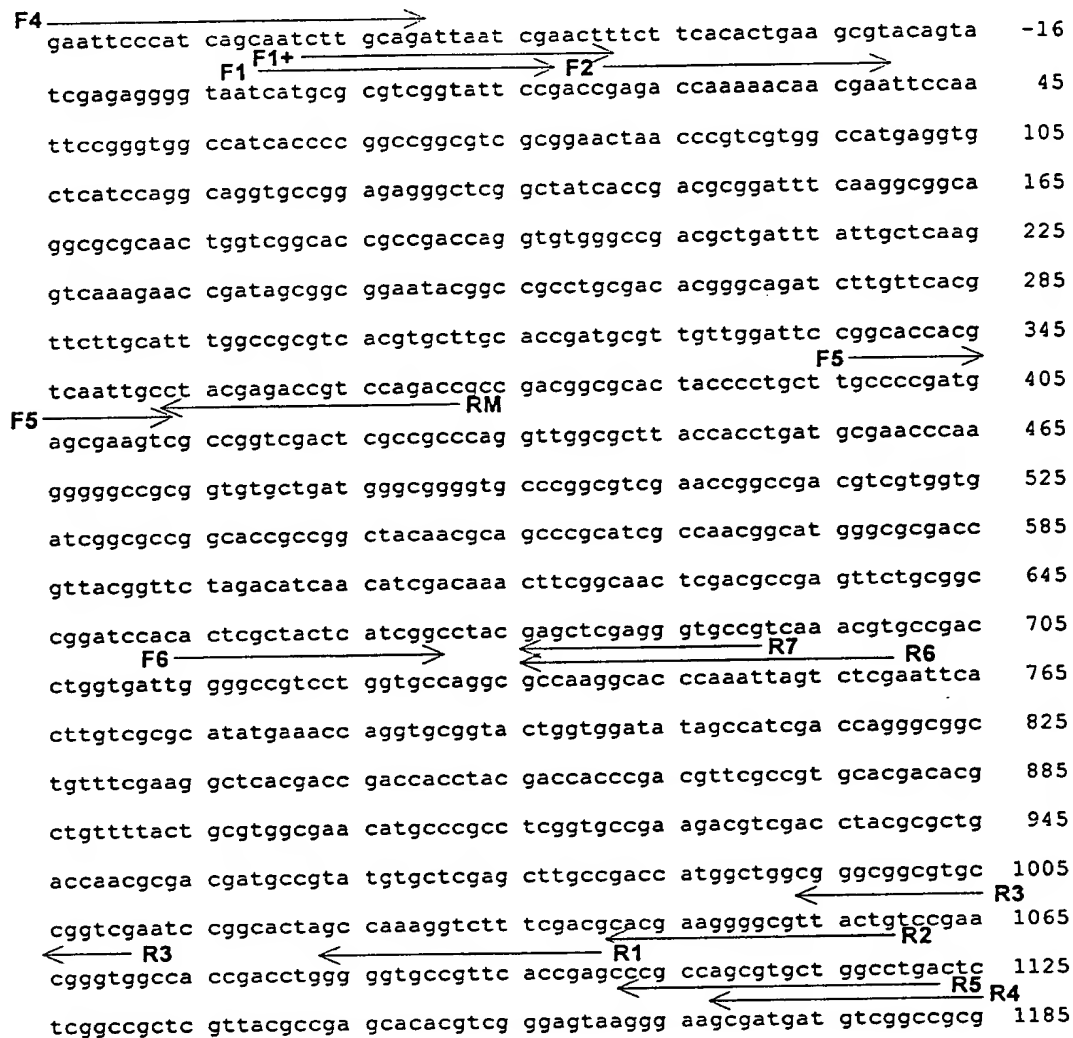


Abb. 2.3 : Die verwendeten Oligos und ihre Lage auf dem *AlaDH*-Gen

## 2.3 Rezepturen

Alle unter diesem Punkt beschriebenen Lösungen wurden weitestgehend nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

### 2.3.1 Nährmedien

#### LB

10 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto-Hefeextrakt (Difco), 10 g NaCl  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,0, autoklavieren

### TB

12 g Bacto-Trypton (Difco), 24 g Bacto-Hefeextrakt (Difco), 4 ml Glycerin (87 %), 2,31 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 12,54 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , die Phosphatlösungen werden getrennt von den anderen Komponenten autoklaviert und hinterher zugemischt

### SOC

2 % Bacto-Trypton (Difco), 0,5 % Bacto-Hefeextrakt (Difco), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Glucose

ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0, die Glucose wird getrennt von den anderen Komponenten autoklaviert und hinterher zugegeben

### LÖWENSTEIN

Benutzt wurden gebrauchsfertige Coletsos Ossein Schrägagarrröhrchen (Sanofi Diagnostics Pasteur).

### FESTMEDIEN:

Zur Herstellung von Platten (90 mm, Greiner) der oben beschriebenen Nährmedien wurde der jeweiligen Rezeptur 1,5% Agar beigemischt.

### ANTIBIOTIKA

Antibiotika wurden den Flüssigmedien kurz vor Gebrauch aus Stammlösungen zugegeben. Bei Herstellung von Festmedien wurde mit der Zugabe gewartet, bis die Lösung nach dem Autoklavieren handwarm war. Benutzt wurden die in Tab. 2.6 aufgeführten Antibiotika.

*Tab. 2.6 : Benutzte Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen*

| Antibiotika     | Endkonzentration | gelöst in               |
|-----------------|------------------|-------------------------|
| Ampicillin      | 100 µg/ml        | Wasser                  |
| Chloramphenicol | 20 µg/ml         | Ethanol                 |
| Gentamicin      | 100 µg/ml        | gebrauchsfertig (Sigma) |
| Kanamycin       | 30 µg/ml         | Wasser                  |

### 2.3.2 Pufferlösungen

L-PUFFER: 50 mM Tris base, 10 mM EDTA, pH 6,8, autoklavieren

TE: 10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 7,4, autoklavieren

TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0, autoklavieren

TBE: 89 mM Tris base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0, autoklavieren

TBS: 50 mM Tris base, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,4, autoklavieren

TBS-TWEEN: TBS +0,05% Tween-20

PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, autoklavieren

## 2.4 Gerätschaften

Aufgeführt sind hier nur allgemeine Geräte, die nicht speziell für eine bestimmte Methode gebraucht wurden.

### CO<sub>2</sub>-SCHRÄNKE

BB16 Function Line (Heraeus)

Modell 3336 Water-Jacketed Incubator (Labotect)

### FPLC-SYSTEM:

Controller : LCC-501 Plus

Pumpen : High Precision Pump P-500

externe Pumpe : Hi Load™ Pump P-50

UV-Zelle : UV-M II

Conductivity Monitor

Ventil : MV-7 / IMV-7

Mixer

Fraktionssammler : Frac-200

Probenschleifen : 1 ml, 2 ml, 5 ml, sowie Superloops von 10 ml und 50 ml

Säulen : HR 10/10, HR 10/30, XK 16/20

Das System wurde gesteuert über einen Compaq ProLinea 4/66 mit der Software FPLC director 1.03.

Das komplette FPLC-System kommt von der Firma Pharmacia.

### MILLI Q-ANLAGE:

Milli Q-UF Plus (Millipore)

PCR - GERÄTE :

Thermocycler Varius M (Landgraf)

Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer)

PETRISCHALEN - DREHTISCH :

Petrischalen-Drehtisch (Schütt)

SCHÜTTLER :

Certomat® U (Braun)

Certomat® V (Braun)

Innova 3000 Water Bath Shaker (New Brunswick Scientific)

SPANNUNGSGERÄTE :

Model 200/2.0 Power Supply (BioRad)

EPS 200 (Pharmacia)

GPS 200/400 (Pharmacia)

SPEED VAC :

Speed Vac SC100 (Savant)

Kühlfalle RT100 (Savant)

Pumpe VP100 (Savant)

SPEKTRALPHOTOMETER :

Ultrospec 3000 (Pharmacia)

Ultrospec K 4053 (Pharmacia) mit Thermostat F34 (Julabo)

THERMOMIXER :

Thermomixer 5437 (Eppendorf)



ULTRASCHALLBAD :

Sonorex Super RK 510 (Bandelin)

WIPPTISCHE :

WT12 (Biometra)

Rockomat (Tecnomara)

ZENTRIFUGEN :

Centrifuge 5402 (Eppendorf)

Centrifuge 5417 (Eppendorf)

Megafuge 1.0 (Heraeus) mit Mikrotiterplatteneinsatz #2708

RC5C (Sorvall) mit Rotoren SS-34, SA-600, GSA und GS-3

## **2.5 Umgang mit Bakterien**

### **2.5.1 Erstellen einer Master Seed Bank**

Um bei allen Experimenten stets die gleichen Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurde von allen Stämmen eine Master Seed Bank angelegt. Dazu wurden die Stämme bis zur späten exponentiellen Phase in den jeweils entsprechenden Medien angezogen. Diese Kultur wurde 1:1 mit 87% Glycerin versetzt und in Aliquots eingefroren.

Eines dieser Aliquots wurde unter dem Mikroskop auf Homogenität untersucht und die Identität durch für den Stamm spezifische Tests (Miniprep, Western Blotting, Aktivitätsfärbung usw.) verifiziert. Weitere Experimente wurden nur noch ausgehend von dieser Master Seed Bank gestartet. Die Ergebnisse werden hierdurch reproduzierbar.

### 2.5.2 Induktionsversuche mit *E.coli*

Ein Aliquot der Master Seed Bank wurde in entsprechendem Medium angeimpft und über Nacht als Schüttelkultur (200 rpm) bei 30°C (hitze-induzierbare Stämme) bzw. 37°C (IPTG-induzierbare Stämme) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine  $A_{600}$  von 0,1 verdünnt und bis zu einer  $A_{600}$  von 0,6 weiter angezogen. Daraufhin erfolgte die Induktion der Kultur. Dies geschah bei hitze-induzierbaren Stämmen durch Inkubation in einem auf 42°C vorgewärmten Schüttelwasserbad (200 rpm). Bei IPTG-induzierbaren Stämmen wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Geschüttelt wurden diese Kulturen weiterhin bei 37°C. Die Induktionszeit betrug je nach Stamm zwischen 1,5 und 3 Stunden.

### 2.5.3 Herstellung von Zellextrakten

Hierzu wurde eine Schüttelkultur für 15 min bei 10.000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1/50 Volumen L-Puffer bzw. 20 mM Tris-HCl, pH 8,1 (*E.coli* CAG629 (pMSK12)) resuspendiert.

Es folgte eine Ultraschallbehandlung entsprechend den Anweisungen der Hersteller (Sonoplus HD 200 (Bandelin) und Labsonic 2000 (Braun)); 2 x 20 Sekunden mit 50 Watt für Mengen bis 2 ml bzw. 10 Minuten in Intervallen mit 200 Watt bei Mengen ab 5 ml). Für Volumina ab 5 ml wurde ein Rosett-Beschallungsgefäß (Heinemann) benutzt. Zur Abtrennung des löslichen Zellextraktes von unlöslichen Bestandteilen wurde zweimal für je 20 min bei 35.000 g und 4°C zentrifugiert.

### 2.5.4 Nachweis der *Escherichia coli* Stämme

In regelmäßigen Abständen wurden die *E.coli*-Stämme auf ihre Identität geprüft, um eine Kontamination der Kulturen auszuschliessen. Hierzu wurde der Bactident®E.coli Kit (Boehringer Mannheim) verwendet. Nachgewiesen werden mittels dieses Tests die Proteine  $\beta$ -D-Glucoronidase und Tryptophanase. Verfahren wurde nach den Anweisungen des Herstellers.

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 PAGE

#### 2.6.1.1 SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Vertikal-Gelkammern von Biometra (Minigel-Twin) benutzt.

Die Dicke der Gele betrug 1 mm.

Für das Konzentrationsgel bzw. das Trenngel wurden verwendet :

KONZENTRATIONSGEL FÜR SDS-GELE (4 %) : 0,35 ml Acrylamidlösung Gel30 (Roth), 0,625 ml Upper Tris, 1,5 ml H<sub>2</sub>O, 12  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (40%), 6  $\mu$ l TEMED

UPPER TRIS : 12,11 g Tris base, 0,8 g SDS, ad 200 ml H<sub>2</sub>O, pH 6,8

TRENNGEL FÜR SDS-GELE (12 %) : 3 ml Acrylamidlösung Gel30 (Roth), 1,9 ml Lower Tris, 2,55 ml H<sub>2</sub>O, 18  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (40%), 12  $\mu$ l TEMED

LOWERTRIS : 36,34 g Tris base, 0,8 g SDS, ad 200 ml H<sub>2</sub>O, pH 6,8

Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 mit 2x SDS-Loading Dye (100 mM Tris base, pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 10 Minuten aufgekocht und danach kurz abzentrifugiert. Als Elektrophoresepuffer diente 25 mM Tris base, 250 mM Glycin, 0,1% SDS.

Die angelegte Spannung betrug 51 Volt bis die Proben ins Gel eingedrungen waren, danach wurde auf 121 Volt erhöht.

Als Marker wurde Dalton Mark VII-L™ (Sigma) verwendet.

### 2.6.1.2 Native PAGE

Es wurde dasselbe System benutzt wie bei der SDS-PAGE. Das Konzentrations- bzw. das Sammelgel bestanden aus :

KONZENTRATIONSGEL FÜR NATIVE GELE (4 %) : 0,25 ml 0,5 M Tris base, pH 6,7, 0,25 ml 0,004% Ribolavinlösung, 1 ml 5% Saccharoselösung, 0,21 ml Acrylamidlösung Gel40 (Roth), 0,29 ml H<sub>2</sub>O, 3 µl TEMED, 6 µl Ammoniumpersulfat (40%)

TRENNGEL FÜR NATIVE GELE (7.5 %) : 1,125 ml 3 M Tris base, pH 8,9, 2,25 ml Acrylamidlösung Gel30 (Roth), 4,9 ml 5% Saccharoselösung , 6 µl TEMED, 12 µl Ammoniumpersulfat (40%)

Elektrophoresepuffer und Loading Dye waren die gleichen wie bei der SDS-PAGE, jedoch ohne SDS und DTT. Die Proben wurden nicht aufgekocht.

Als Marker wurde der Kit MS II *for non-denaturing systems* (Serva) verwendet.

### 2.6.1.3 Färbemethoden

#### 2.6.1.3.1 Hot Coomassie Färbung

Diese Färbemethode diene als Standardmethode bei der Analyse von Expressionsversuchen und FPLC-Fraktionen (nach Westermeier, Pharmacia-Protokoll).

Das Gel wird für mindestens 30 Minuten in Fixierlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure, 50% Wasser) gelegt. Die Färbung erfolgt für 10 Minuten in auf 60°C vorgewärmter Coomassie-Lösung (0,29 g Coomassie Brilliant Blue R250 in 250 ml Entfärbelösung). Danach wurde das Gel kurz mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend in Entfärbelösung (25% Ethanol, 8% Essigsäure, 67% Wasser) in einem Model 556 Gel Destainer (BioRad) entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren. Das Gel wurde in 10% Glycerin gelagert.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß ganz auf Methanol verzichtet werden kann. Zudem ist die Intensität der Banden im Vergleich zur normalen Coomassie-Färbung stärker und die Hintergrundfärbung bei guter Entfärbung minimal.

#### 2.6.1.3.2 Silber-Färbung

Diese Färbemethode wurde zur Analyse von aufgereinigten Proteinpräparationen benutzt. Die höhere Sensitivität dieses Assays, im Vergleich zur Coomassie-Färbung, gibt bessere Aufschlüsse über den tatsächlichen Reinheitsgrad einer Proteinpräparation.

Die Silber-Färbung von Proteingelen wurde mit dem Silver Stain Plus Kit (BioRad) durchgeführt (Gottlieb & Chavko, 1987). Die Prozedur unterteilt sich in vier Abschnitte : dem Fixierschritt, zwei Waschschritten und einem Färbeschritt. Verfahren wurde hierbei nach den Anweisungen des Herstellers.

Die Färbung beruht auf der Reduktion von Silberionen an den Seitenketten der Aminosäuren (Switzer *et al.*, 1979, Merril *et al.*, 1984).

### 2.6.2 Konzentrierung und Umpufferung

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurde, je nach experimentellem Ablauf, eine Speed Vac oder Centricon bzw. Centriprep-Konzentratoren (Amicon) benutzt.

Zur Umpufferung wurden Dialyseschläuche mit einem CutOff von 1.000 Dalton verwendet (Spectrapor, Breite der Schläuche je nach Volumen der Lösung entweder 10 mm oder 40 mm). Dialysiert wurde bei 4°C gegen das 500 - 1000 fache Volumen an Zielpuffer mit mindestens einmaligem Pufferwechsel.

### 2.6.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in Lösungen wurde der BioRad Protein Assay Kit (BioRad) verwendet. Das Prinzip dieses Assay beruht auf der Tatsache, daß sich das Absorptionsmaximum einer sauren, Coomassie Brilliant Blue G-250 - haltigen Lösung nach Zugabe von Protein von 465 nm nach 595 nm verlagert (Bradford, 1976). Der Extinktionskoeffizient des sich bildenden Farbstoff-Protein-Komplexes ist über einen weiten Bereich konstant (Spector, 1978).

Es wurde nach der Microassay Procedure verfahren. Dazu wurde die zu untersuchende Proteinlösung auf ein Volumen von 0,8 ml gebracht, in der sich weniger als 20 µg Protein befanden. Zu diesen 0,8 ml Proteinlösung wurden 0,2 ml Dye Reagent Concentrate (BioRad) gegeben und gut gemischt. Nach 10 Minuten wurde die optische Dichte bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen. Auf die gleiche Weise wurde mit  $\gamma$ -Globulin (Rinderplasma) eine Eichkurve erstellt, aus der dann die unbekannte Proteinkonzentration bestimmt wurde.

## 2.6.4 Alanin Dehydrogenase Assays

### 2.6.4.1 Qualitativer Assay

Der qualitative Nachweis der AlaDH beruht auf einer Reihe von Redoxreaktionen, gemäß folgendem Reaktionsschema (Inagaki *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1992) :

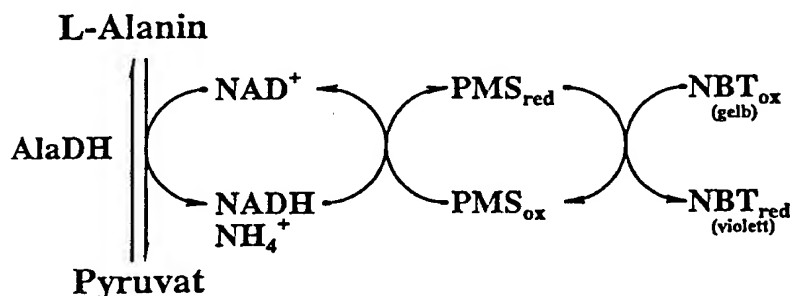


Abb. 2.4 : Prinzip des Alanin Dehydrogenase - Assays

Das violette Endprodukt ist hierbei sehr gut mit dem bloßen Auge zu erkennen. Dieser Assay wurde einerseits zum schnellen Screening von FPLC-Fractionen und andererseits zur Demonstration von AlaDH-Aktivität in nativen Proteingelen benutzt.

Basis dieses Assay ist ein Reaktionsmix bestehend aus 1/2 Vol. 0,5 M Glycin-KOH, pH 10,2 und je 1/8 Vol. 0,5 M L-Alanin, 6,25 mM NAD<sup>+</sup>, 2,4 mM NBT und 0,64 mM PMS.

Zur Analyse von Proteinfractionen wurde der Substratmix 1:1 mit der zu testenden Lösung versetzt. Native Gele wurden nach der Elektrophorese direkt in 10 ml Substratmix inkubiert.

Eine positive Reaktion ist nach spätestens 5 min zu erkennen.

#### 2.6.4.2 Semiquantitativer Assay

Dieser Assay wurde zur Untersuchung von AlaDH-Aktivitäten in Mykobakterien verwendet.

Die Mykobakterien wurden auf Löwenstein-Medium angezogen. Mit der Impföse wurden Bakterien von den Schrägagar-Röhrchen abgenommen, in Wasser resuspendiert und auf eine Trübung äquivalent zu einem McFarland Standard Nr.5 eingestellt. Zur Trennung von Zellaggregaten wurden die Suspensionen für 10 min im Ultraschallbad behandelt.

Anschließend wurden die Zellen 1:1 mit Reaktionsmix (siehe 2.6.4.1) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 20.000 g wurde die Absorption des Überstandes gegen den Blindwert gemessen.

Als Referenzmessung diente ein Ansatz, dem kein L-Alanin zugesetzt war.

Eine Absorptionsänderung von einer Einheit pro Minute in diesem Test entspricht etwa einer Absorptionsänderung von drei Einheiten pro Minute beim quantitativen Assay (Messung bei 340 nm, siehe 2.6.4.3).

#### 2.6.4.3 Quantitativer Assay

Bei diesem Assay wurde direkt die quantitative Änderung des NADH-Gehaltes bei 340 nm gemessen.

Die Standardreaktionsansätze hatten ein Volumen von 1 ml. Die Zusammensetzung ist in Tab. 2.7 gezeigt. Die Absorption wurde über 10 min hinweg bei 37°C und 340 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von NADH beträgt bei 340 nm  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ .

Die Standardansätze wurden zur Bestimmung der biochemischen Eigenschaften des Enzyms wie jeweils im Text angegeben variiert. Jeder dargestellte Meßpunkt stellt den Mittelwert aus mindestens zwei, in der Regel aber drei, unabhängigen Messungen dar.



Eine AlaDH-Einheit ist als die Enzymmenge definiert, die in einer Minute die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  NADH in der oxidativen Desaminierung katalysiert.

*Tab. 2.7 : Zusammensetzung des quantitativen AlaDH-Assays*

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die oxidative Desaminierung ist links, die für die reduktive Aminierung rechts gezeigt.

| Oxidative Desaminierung    | Reduktive Aminierung   |
|----------------------------|--|
| 125 mM Glycin-KOH, pH 10,2 | 1 M $\text{NH}_4\text{Cl}$ / $\text{NH}_4\text{OH}$ , pH 7,4 |
| 100 mM L-Alanin            | 20 mM Pyruvat  |
| 1,25 mM $\text{NAD}^+$     | 0,5 mM NADH  |

### 2.6.5 Densitometrie

Densitometrie wurde benutzt um eine Quantifizierung des Expressionslevels der AlaDH zu machen. Desweiteren wurden hiermit die Signale der Epitopkartierung quantifiziert und ins Verhältnis zueinander gesetzt.

Die Durchführung erfolgte mit einem Personal Densitometer (Molecular Dynamics) mit der Software Image Quant (Molecular Dynamics).

### 2.6.6 Amino-terminale Proteinsequenzierung

Die Lösung mit dem zu analysierenden Protein wurde elektrophoretisch aufgetrennt (2.6.1.1), auf eine Immobilon™ PVDF-Membran (Millipore) geblottet (2.8.1) und mit Coomassie Brilliant Blue (0,29 g Coomassie Brilliant Blue R250 in 250 ml 25% Ethanol, 8% Essigsäure, 67% Wasser) gerade solange angefärbt, bis die Proteinbanden zu erkennen waren (etwa 1-5 min). Die gesuchte(n) Bande(n) wurde(n) ausgeschnitten, zweimal für je 10 min mit 20 ml Wasser gewaschen und zur Sequenzierung gegeben.

Die amino-terminalen Proteinsequenzierungen wurden von Frau Rita Getzlaff und Herrn Dr. Michael Kieß (beide GBF, Braunschweig) an einem Proteinsequencer 473A von Applied Biosystems durchgeführt.

## **2.6.7 Proteinaufreinigung**

### **2.6.7.1 Hitzedenaturierung**

Der lösliche Zellextrakt wurde in einem Wasserbad für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde für 45 min bei 35.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverarbeitet.

### **2.6.7.2 FPLC**

#### **2.6.7.2.1 Anionenaustauscher-Chromatographie**

Als Anionenaustauschermaterial diente Q-Sepharose HP (Pharmacia). Dieses Material besteht aus relativ kleinen und homogenen Partikeln, und zeigt deshalb eine gute Auflösung bei gleichzeitig hoher Kapazität. Die Säule wurde wie vom Hersteller ausgewiesen nach jedem Lauf regeneriert.

Als Auftragspuffer fungierte 20 mM Tris-HCl, pH 8,1, als Elutionspuffer derselbe Puffer plus 1 M KCl.

#### **2.6.7.2.2 Affinitätschromatographie**

Benutzt wurde Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia). Dieses Material trägt als funktionelle Gruppe den Farbstoff Cibacron Blue F3G-A (Böhme *et al.*, 1972). Dieser Farbstoff hat v.a. Affinität zu Enzymen die Adenin-enthaltende Cofaktoren benötigen,

aber auch zu einigen anderen Proteinen wie z.B. Albumin oder Interferon, für die die genaue Wechselwirkung mit dem Farbstoff nicht bekannt ist (Haff & Easterday, 1992).

Das lyophilisierte Trägermaterial wurde vor dem ersten Benutzen in MilliQ-Wasser jequellt und nach jedem Lauf wie vom Hersteller angegeben regeneriert.

Benutzt wurde das gleiche Puffersystem wie bei der Anionenaustauscher-Chromatographie.

## **2.7 DNA-Methoden**

### **2.7.1 Transformation**

Die Herstellung der kompetenten Zellen und die Elektroporation erfolgte nach den Angaben des Herstellers des E.coli Pulsers (BioRad).

#### **2.7.1.1 Herstellung kompetenter Zellen**

Eine Übernachtskultur wurde am darauffolgenden Tag auf eine  $A_{600}$  von 0,1 verdünnt und bis zu einer  $A_{600}$  von 0,6 weitergeschüttelt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 4.000 g und 4°C in vorgekühlten Zentrifugenbechern. Die Zellen wurden zweimal mit Wasser gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Danach erfolgte ein Waschschrift in 10% Glycerin (1/50 des Ursprungsvolumen).

Zuletzt wurden die Zellen in 1/500 des Ursprungsvolumen 10% Glycerin aufgenommen. Die Konzentration der Zellen beträgt hierbei etwa  $3 \times 10^{10}$  Zellen/ml. Diese Suspension wurde aliquotiert (40 µl) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen sind auf diese Weise bei -70°C mehrere Monate in kompetentem Zustand haltbar.

Alle Flüssigkeiten die zu diesen Schritten benutzt wurden waren auf 4°C vorgekühlt.

### 2.7.1.2 Elektroporation

40  $\mu$ l der aufgetauten kompetenten Zellen wurden mit 2  $\mu$ l DNA (0,5-1  $\mu$ g) gemischt und auf Eis eine Minute inkubiert. Danach wurden sie auf den Boden einer 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert. Es erfolgte ein einzelner Stromstoß (E.coli Pulser, BioRad) von 12,5 kV/cm (2,5 kV, 200 Ohm, 25  $\mu$ F). Sofort nach dem Stromstoß wurde 1 ml SOC-Medium in die Küvette gegeben um die Zellen zu resuspendieren. Nach einstündiger Inkubation bei 30 bzw. 37°C (je nach Eigenschaften von Stamm und Plasmid; siehe 2.1.1.1) wurden die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert.

### 2.7.2 Plasmid-Gewinnung (Miniprep)

#### 2.7.2.1 Standardmethode

Diese Methode beruht im wesentlichen auf dem gängigen Verfahren zur Isolation von Plasmid-DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 20.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l 25 mM Tris base, pH 8,0, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l 0,2 M NaOH, 1% SDS zugegeben, stark geschüttelt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 150  $\mu$ l 3 M Natrium-Acetat, pH 4,8 wurde kurz gevortext und nochmals 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 20.000 g. Der resultierende Überstand wurde mit dem doppelten Volumen Ethanol versetzt, 30 Minuten bei -20°C inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu$ l 0,1 M Natrium-Acetat, 50 mM Tris base, pH 8,0 resuspendiert und anschließend nochmals auf die gleiche Weise mit Ethanol gefällt, zentrifugiert und getrocknet. Am Ende wurde das Pellets in 20  $\mu$ l TE aufgenommen.

### 2.7.2.2 Jetstar

Alternativ wurden Minipreps mit Komponenten des Jetstar Kits (Genomed) durchgeführt. Der Vorteil hierbei ist, daß die Plasmidpräparationen direkt für die automatische DNA-Sequenzierung (2.7.11) geeignet sind.

Die Zellen wurden wie bei der Standardmethode (2.7.2.1) geerntet und dann in 0,4 ml Solution E1 (50 mM Tris-HCl, pH8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase) aufgenommen. Nach der Zugabe von 0,4 ml Solution E2 (200 mM NaOH, 1,0% SDS) wurde kurz geschüttelt und dann für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 0,4 ml Solution E3 zugegeben (3,2 M Kalium-Acetat, Essigsäure, pH 5,5) und nochmals kurz geschüttelt. Die Lösung wurde sodann für 10 min bei RT und 20.000 g abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 4°C und 20.000 g erneut abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Am Ende wurde es wie bei der Standardmethode in TE aufgenommen.

### 2.7.3 Ethanol-Fällung von DNA

Der zu fällenden DNA-Lösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat, pH 4,8 und 2 Volumen Ethanol z.A. zugesetzt. Danach wurde kurz gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 20.000 g und RT. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, 10 min in der Speed Vac getrocknet und je nach Bedarf in einem geeigneten Puffer oder Wasser aufgenommen.

### 2.7.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Verwendung sämtlicher Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20 µl, bei größeren Ansätzen 100 µl.

Benutzt wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs und Boehringer Mannheim.

### 2.7.5 Abtrennung von Proteinen aus DNA-Lösungen

Um Proteine aus DNA-Präparationen zu entfernen, beispielsweise zur Abtrennung von Restriktionsenzymen vor der Ligation, wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und für 15 sec gevortext. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 20.000 g und RT wurde die wässrige Phase abgetrennt und nochmals mit Phenol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA einer Ethanol-Fällung (2.7.3) unterzogen.

### 2.7.6 Ligation

Ligationen wurden durchwegs in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Der Ansatz beinhaltete 20 fmol des Vektors, 60 fmol des Inserts, 1 U T4-DNA-Ligase, Ligase-Puffer und 0,5 mM ATP (alles Boehringer Mannheim). Die Ligation erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur und dann ÜN bei 16°C.

### 2.7.7 Elektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte, je nach Größe der Fragmente, in 0,5 - 2 % Agarose-Gelen. Als Puffer wurde TBE verwendet.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 1:5 mit Laufpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 15% Ficoll-Typ 400) und 1:10 mit SYBR-Green (0,2% SYBR™ Green I (MoBiTec) in DMSO) versetzt. Dem Farbstoff wurde zehn Minuten Zeit gegeben um in die DNA zu interkalieren. Die angelegte Spannung betrug 81 V.

Als Gelkammern wurden eine Wide Mini-Sub™ Cell (BioRad) und ein DNA Pocket-Bloc UV (BIOzym Diagnostik) verwendet.

### 2.7.8 Gewinnung von mykobakterieller DNA

Die Mykobakterien wurden auf Löwenstein-Medium angezogen. Eine Impföse voll Bakterien wurde dem Schrägagar-Röhrchen entnommen und in 0,5 ml TE resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,5 ml Glasperlen (150-212 microns, Sigma) wurde 10 min bei 80°C inkubiert. Zum Aufschluß der Bakterien wurde die Suspension für eine Minute in einem Mini-Bead Beater (Biospec Products) bei höchster Leistung behandelt.

Der Überstand kann nun direkt in die PCR eingesetzt werden.

### 2.7.9 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu eluierende Bande wurde mit einem Skalpell aus einem DNA-Gel (2.7.4) ausgeschnitten.

Für die weiteren Schritte wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) benutzt. Verfahren wurde nach den Angaben des Herstellers.

Die Ausbeute der Elution wurde auf einem Agarosegel kontrolliert.

### 2.7.10 PCR

Hierzu wurde der *GeneAmp*® PCR Kit (Perkin Elmer) benutzt. Es wurde weitestgehendst nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Im Ansatz waren enthalten :

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
- 50 mM KCl
- je 200 µM jedes dNTP's
- 2,5 Units *AmpliTaq*® DNA Polymerase
- je 1 µM jedes Primers
- 1,5 - 3 mM MgCl<sub>2</sub> (genaue Konzentrationen sind jeweils im Text angegeben)
- 1 - 2 µg chromosomale bzw. 50 - 100 ng Plasmid-DNA oder DNA einer vorhergehenden PCR

Gefahren wurden stets 40 Zyklen mit der Abfolge :

|                  |         |                          |
|------------------|---------|--------------------------|
| <i>melting</i>   | 1-2 min | 96°C                     |
| <i>annealing</i> | 1-2 min | abhängig von den Primern |
| <i>extension</i> | 3 min   | 72°C                     |

Die genauen Bedingungen sind jeweils angegeben.

### 2.7.11 DNA-Sequenzierung

Benutzt wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). Es handelt sich hierbei um einen PCR-Sequenzierungskit.

Der Sequenzierungsansatz wurde wie vom Hersteller angegeben hergestellt. Gefahren wurden 30 Zyklen gemäß der Abfolge :



|                  |        |                     |
|------------------|--------|---------------------|
| <i>melting</i>   | 15 sec | 96°C                |
| <i>annealing</i> | 15 sec | abhängig vom Primer |
| <i>extension</i> | 4 min  | 60°C                |

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde der komplette Ansatz einer Ethanol-Fällung unterzogen (siehe 2.7.3) und anschließend in 3 µl Formamid, 25 mM EDTA (5:1) aufgenommen.

Sequenziert wurde an einem 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems).

---

Desweiteren wurden mit dem selben Testsystem 14 weitere Produzenten mykobakterieller Antigene überprüft (Tab. 2.2).

All diese Stämme zeigten ebenfalls keine erhöhten Überlebensraten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollstämmen. Bei den meisten Stämmen war hiervon auch auszugehen, da es sich um relativ gut charakterisierte Hitzeschockproteine handelt.

### 3.5 Die Verbreitung der Alanin Dehydrogenase innerhalb der Mykobakterien

Sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene, sollte als nächstes untersucht werden, in welchen Mykobakterien eine Alanin Dehydrogenase vorhanden ist. Ausgehend von der Virulenz war hierbei die Fragestellung, ob die AlaDH-Aktivität mit dieser Eigenschaft korreliert.

#### 3.5.1 *In vivo* AlaDH-Aktivität

Da AlaDH-Aktivität in der Mikrowelt eher die Ausnahme als die Regel darstellt, war es interessant zu hinterfragen, ob dieses Enzym innerhalb der Mykobakterien ubiquitär ist, oder ob es auf bestimmte Spezies und Stämme beschränkt ist. Dadurch können dann wiederum Rückschlüsse auf Fragen gezogen werden wie :

- ✎ Haben AlaDH produzierende Stämme Gemeinsamkeiten in der Lebensweise ?
- ✎ Induziert eine bestimmte Wachstumsweise oder - phase die AlaDH-Produktion ?
- ✎ Wie erfolgt die Regulation der AlaDH ?
- ✎ Können andere Stoffwechselwege die von der AlaDH katalysierte Reaktion ersetzen ?
- ✎ Welchen Phänotyp müssten *AlaDH* Mutanten zeigen ?

Es wurden deshalb alle verfügbaren Stämme auf Produktion von AlaDH-Aktivität hin untersucht. Das Repertoire umfasste insgesamt 44 mykobakterielle Stämme, die 29 verschiedene Spezies repräsentieren. Zudem wurden die beiden mit den mykobakterien eng verwandten Stämme *Nocardia asteroides* und *Rhodococcus equi* getestet.

Um die im Testsystem gemessenen Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, wurden alle Bakteriensuspensionen auf eine Dichte eingestellt, die der Trübung eines McFarland Standards Nr.5 entspricht. Die Stämme befanden sich zum Zeitpunkt der Messung in der späten exponentiellen Phase.

Neben der AlaDH-Messung wurde auch eine Messung durchgeführt, bei der im Reaktionsansatz L-Alanin fehlte. Die Aktivität dieses Ansatzes ist ein Maß für andere parallel ablaufende NAD<sup>+</sup>-reduzierende Prozesse. Die Differenz zwischen diesem Ansatz und dem Standardansatz entspricht der Netto-AlaDH-Aktivität ( $\Delta A_{595}$ -Wert).

Gemäß der gemessenen Aktivitäten lassen sich die untersuchten Stämme in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist die der **stark-positiven** Stämme (Tab.3.11). In dieser Gruppe sind die Stämme zusammengefasst, die eine AlaDH-Aktivität von mehr als 0,5  $\Delta A_{595}$ -Einheiten im benutzten Testsystem aufweisen.

Tab 3.11 : Stämme mit stark-positiver AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

| Stamm                                   | AlaDH-Aktivität [ $\Delta A_{595}$ ] |
|---|--------------------------------------|
| <i>M.marinum</i> 3                      | 2,327                                |
| <i>M.chelonae</i> 7                     | 1,842                                |
| <i>M.microti</i> 1                      | 0,919                                |
| <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>v</sub> | 0,592                                |

Als stark-positiv klassifiziert wurden die beiden für Fische pathogenen Stämme *M.chelonae* und *M.marinum*, sowie die beiden ebenfalls pathogenen Stämme *M.microti* und *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>, letzteres ein virulenter Tuberkulose-Referenzstamm.

Die zweite Gruppe, die der mäßig-positiven Stämme, umfasst jene mit einer Aktivität zwischen 0,1 und 0,5  $\Delta A_{595}$ -Einheiten (Tab.3.12).

Tab.3.12 : Stämme mit mäßig-positiver AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

| Stamm                     | AlaDH-Aktivität<br>[ $\Delta A_{595}$ ] | Stamm                     | AlaDH-Aktivität<br>[ $\Delta A_{595}$ ] |
|---------------------------|---|---------------------------|---|
| <i>M.smegmatis</i> 3      | 0,375                                   | <i>M.tuberculosis</i> 49  | 0,138                                   |
| <i>M.ulcerus</i> 1        | 0,369                                   | <i>M.tuberculosis</i> 130 | 0,118                                   |
| <i>M.africanum</i> 1      | 0,287                                   | <i>M.smegmatis</i> 1      | 0,116                                   |
| <i>M.tuberculosis</i> 118 | 0,210                                   | <i>M.tuberculosis</i> 132 | 0,111                                   |
| <i>M.tuberculosis</i> 145 | 0,190                                   | <i>M.tuberculosis</i> 146 | 0,111                                   |
| <i>M.intracellulare</i> 1 | 0,155                                   | <i>M.tuberculosis</i> 1   | 0,110                                   |

In dieser Gruppe finden sich, außer *M.smegmatis*, nur pathogene, klinische Isolate von *M.tuberculosis* und anderen Mykobakterien wieder. Beide getesteten Stämme von *M.smegmatis* zeigen jedoch auch sehr hohe NAD<sup>+</sup>-reduzierende Aktivitäten in Abwesenheit von L-Alanin. Es ist an dieser Stelle noch wichtig zu erwähnen, daß der Stamm *M.smegmatis* 1-2c (ein Derivat von *M.smegmatis* mc<sup>26</sup>; Zhang *et al.*, 1991; Garbe *et al.*, 1994; von Dr. Peadar Ó Gaora, St.Mary's Hospital, London), ein Stamm für genetische Arbeiten in Mykobakterien, keine AlaDH-Aktivität zeigt, aber ebenfalls über eine hohe Hintergrundaktivität verfügt.

In der letzten Gruppe schließlich sind alle Stämme aufgeführt, die als für AlaDH-Aktivität **negativ** befunden wurden, d.h. die eine Aktivität von weniger als 0,1  $\Delta A_{595}$ -Einheiten aufweisen (Tab.3.13).

Tab.3.13 : Stämme ohne AlaDH-Aktivität

Die Durchführung dieses Assays ist in 2.6.4.2 beschrieben.

| Stamm                                   | AlaDH-Aktivität<br>[ $\Delta A_{595}$ ] | Stamm                     | AlaDH-Aktivität<br>[ $\Delta A_{595}$ ] |
|---|---|---------------------------|---|
| <i>N.asteroides</i> 1                   | 0,048                                   | <i>M.bovis</i> BCG 4      | 0,001                                   |
| <i>M.flavescens</i> 1                   | 0,042                                   | <i>M.terrae</i> 2         | 0,001                                   |
| <i>M.tuberculosis</i> H37R <sub>a</sub> | 0,032                                   | <i>M.tuberculosis</i> 60  | 0                                       |
| <i>M.nonchromogenium</i> 1              | 0,026                                   | <i>M.tuberculosis</i> 163 | 0                                       |
| <i>M.fortuitum</i> 11                   | 0,022                                   | <i>M.gastri</i> 1         | 0                                       |
| <i>M.asiaticum</i> 1                    | 0,021                                   | <i>M.gordonae</i> 3       | 0                                       |
| <i>M.bovis</i> BCG 2                    | 0,013                                   | <i>M.kansasii</i> 1       | 0                                       |
| <i>M.lufu</i> 1                         | 0,013                                   | <i>M.parafortuitum</i> 1  | 0                                       |
| <i>R.equi</i> 1                         | 0,011                                   | <i>M.perigrinum</i> 1     | 0                                       |
| <i>M.bovis</i> 3                        | 0,010                                   | <i>M.phlei</i> 1          | 0                                       |
| <i>M.scrofulaceum</i> 1                 | 0,009                                   | <i>M.phlei</i> 4          | 0                                       |
| <i>M.intracellulare</i> 5               | 0,007                                   | <i>M.scrofulaceum</i> 8   | 0                                       |
| <i>M.thermosresistibile</i> 1           | 0,006                                   | <i>M.simiae</i> 1         | 0                                       |
| <i>M.avium</i> 1                        | 0,002                                   | <i>M.vaccae</i> 3         | 0                                       |
| <i>M.triviale</i> 1                     | 0,002                                   | <i>M.xenopi</i> 7         | 0                                       |

Diese weitaus größte Gruppe umfaßt vor allem opportunistische und nicht-pathogene Stämme, sowie die beiden mit den Mykobakterien verwandten Stämme *Nocardia asteroides* und *Rhodococcus equi*. Ausnahme waren zwei klinische Tuberkulose-

Isolate, sowie der Erreger der Rinder-Tb, *M.bovis*, aber auch die beiden untersuchten Impfstämme von *M.bovis* BCG.

Eine graphische Darstellung der AlaDH-Aktivitäten ist in Abb. 3.16 nach phylogenetischen Gesichtspunkten geordnet wiedergegeben.

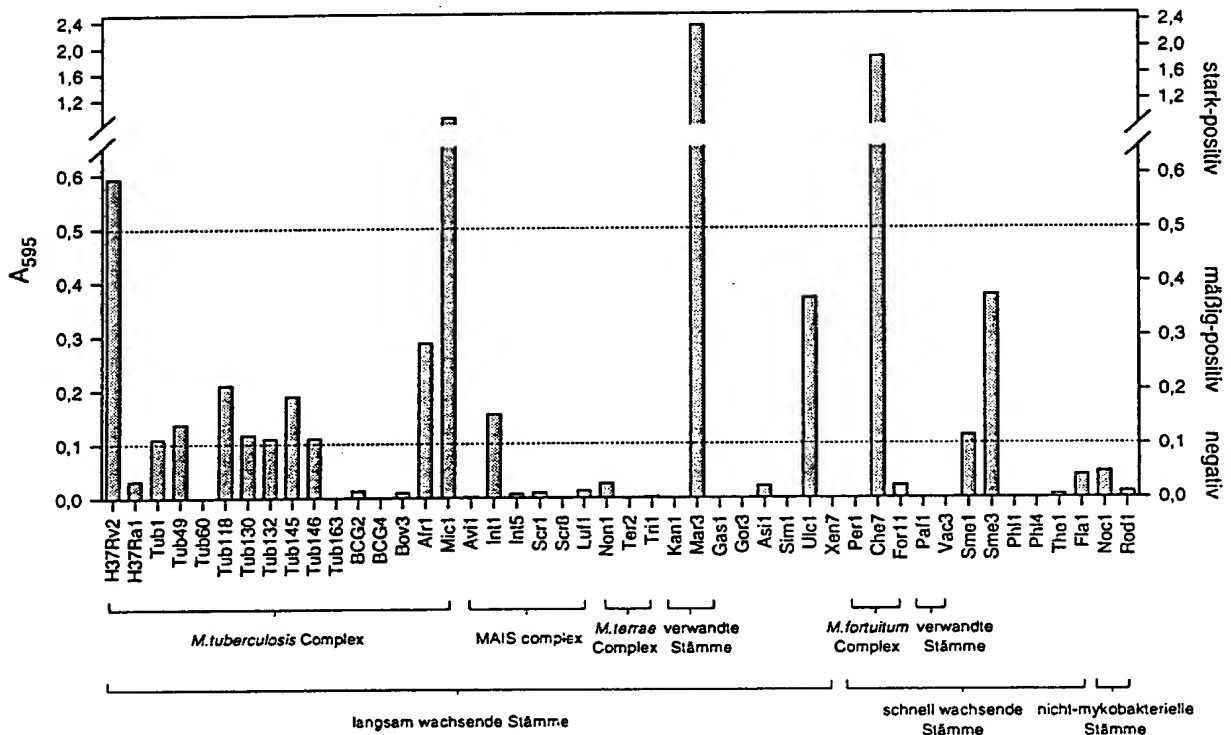


Abb. 3.16 : AlaDH-Aktivität im Reich der Mykobakterien

Die genaue Bezeichnung der einzelnen Stämme ist in Tab. 2.3 wiedergegeben. Die Angaben *schnell wachsend* bzw. *langsam wachsend* dürfen nicht streng genommen werden, sondern stellen vielmehr eine Tendenz innerhalb der gezeigten Gruppen dar.

Zusammenfassend läßt sich die Verbreitung von AlaDH-Aktivität innerhalb der Welt der Mykobakterien so beschreiben :

- ① Die mit Abstand höchste Aktivität zeigen die beiden für Fische pathogenen Stämme *M.chelonae* und *M.marinum*.

② Innerhalb der Stämme von *M.tuberculosis* ist eine Tendenz vorhanden, nach der mit abnehmender Virulenz auch die AlaDH-Aktivität abnimmt ( $H37R_v > \text{klinische Isolate} > H37R_a$ ).

③ Alle als positiv klassifizierten Stämme sind virulent. Einzige Ausnahme ist *M.smegmatis*, das aber anhand seiner hohen Hintergrundaktivität leicht zu unterscheiden ist.

④ Nicht alle virulenten Stämme sind AlaDH positiv.

⑤ *M.tuberculosis* läßt sich mittels AlaDH-Aktivität vom Impfstamm *M.bovis* BCG unterscheiden.

### 3.5.2 Das Gen für die Alanin Dehydrogenase

#### 3.5.2.1 Die ersten PCR-Fragmente

Nachdem nun die AlaDH-Aktivitäten innerhalb der verschiedenen Stämme quantifiziert worden waren, stellte sich als nächstes die Frage, warum einige Stämme das Enzym produzieren, andere aber nicht. Auch das Ausmaß der Expression unterscheidet sich selbst zwischen eng verwandten Arten teilweise deutlich.

Das Fehlen meßbarer Aktivität kann bis zu einem gewissen Grad eine Erklärung darin finden, daß sich nicht alle Stämme in der exakt selben Wachstumsphase befanden, da es sehr schwer ist alle Stämme parallel, im gleichen Stadium befindlich anzuziehen. Aber das Ausbleiben von Aktivität könnte auch einen Grund darin haben, daß sich genetische Änderungen auf die Expression des Gens auswirken. Diese Änderungen könnten im kodierenden oder im regulatorischen Bereich aufgetreten sein.

Um diese Tatsache zu überprüfen wurde versucht das *AlaDH*-Gen aus verschiedenen Stämmen mittels PCR ganz oder teilweise zu amplifizieren. Als Primer dienten hierzu

auf der Sequenz von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> basierende Oligonukleotide (Andersen et al., 1992; siehe Abschnitt 2.2.2, Tab. 2.5).

Die zum Nachweis der AlaDH verwendeten Primerpaare, die jeweils zu erwartende Länge der Produkte und die jeweils benutzten *Annealing*-Temperaturen der PCR sind in Tab. 3.14 zusammengefasst.

**Tab.3.14 : Primerpaare zur Detektion der AlaDH in Mykobakterien**

Die Sequenzen der Primer sind in Tab. 2.5 wiedergegeben.

| Bezeichnung      | Primer #1 | Primer#2 | Produkt | Temperatur |
|------------------|-----------|----------|---------|------------|
| <i>Annabel</i>   | AlaDH-F1  | AlaDH-RM | 433 bp  | 65°C       |
| <i>Beatrice</i>  | AlaDH-F1  | AlaDH-R2 | 1102 bp | 45°C       |
| <i>Claudette</i> | AlaDH-F1  | AlaDH-R3 | 1120 bp | 55°C       |
| <i>Désirée</i>   | AlaDH-F1  | AlaDH-R6 | 1072 bp | 45°C       |
| <i>Eleonore</i>  | AlaDH-F1+ | AlaDH-R1 | 1099 bp | 55°C       |
| <i>Francoise</i> | AlaDH-F1+ | AlaDH-R2 | 1117 bp | 50°C       |
| <i>Giselle</i>   | AlaDH-F2  | AlaDH-R7 | 757 bp  | 35°C       |
| <i>Helen</i>     | AlaDH-F4  | AlaDH-RM | 1080 bp | 55°C       |
| <i>Isabelle</i>  | AlaDH-F4  | AlaDH-R6 | 1050 bp | 55°C       |
| <i>Jeanette</i>  | AlaDH-F5  | AlaDH-R1 | 507 bp  | 45°C       |
| <i>Karen</i>     | AlaDH-F5  | AlaDH-R4 | 834 bp  | 45°C       |
| <i>Larissa</i>   | AlaDH-F6  | AlaDH-R4 | 786 bp  | 55°C       |
| <i>Melanie</i>   | AlaDH-F6  | AlaDH-R5 | 405 bp  | 55°C       |

Die ersten Versuche das Gen für die AlaDH in verschiedenen mykobakteriellen Spezies zu detektieren erfolgte mit dem Primerpaar *Annabel*. Das hierbei erhaltene Ergebnis war einigermaßen überraschend. Alle Stämme des *M.tuberculosis* Complex



zeigten das erwartete Fragment von 433 bp. Darüber hinaus war bei all diesen Stämmen ein zusätzliches Fragment von etwa 900 bp amplifiziert worden (Abb.3.17).

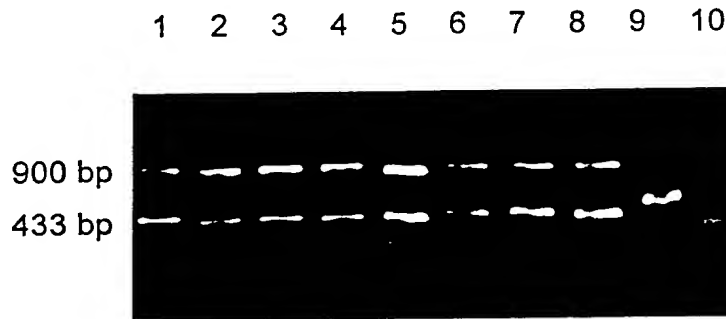


Abb. 3.17 : PCR verschiedener Stämme mit dem Primerpaar Annabel.

Gefahren wurden bei diesen PCR's jeweils 40 Zyklen mit der Abfolge : *melting* 2 min bei 96°C, *annealing* 2 min bei 65°C und *extension* 3 min bei 72°C. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration betrug 1,5 mM.

Bahn 1 : *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>

Bahn 2 : *M.tuberculosis* H37R<sub>a</sub>

Bahn 3 : *M.tuberculosis* 1

Bahn 4 : *M.bovis* 3

Bahn 5 : *M.bovis* BCG 2

Bahn 6 : *M.bovis* BCG 4

Bahn 7 : *M.africanum* 1

Bahn 8 : *M.microti* 1

Bahn 9 : *M.marinum* 3

Bahn 10 : *M.chelonae* 7

Wie sich herausstellen sollte, war dieses zweite Fragment ebenfalls ein Teil des *AlaDH*-Gens, das durch Anlagerung des Primers AlaDH-RM an einer weiter C-terminal gelegenen Stelle entstanden ist. Durch Erhöhung der *Annealing*-Temperatur bei der PCR von 65 auf 69°C konnte dieses zweite Fragment unterdrückt werden (siehe Abb. 3.18, Bahn 2 und 3).

Das eigentlich erstaunliche war jedoch das Erscheinen des amplifizierten Fragments in allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex, unabhängig vom Vorhandensein von AlaDH-Aktivität.

Auch bei einigen anderen Stämmen konnte mit dem Primerpaar *Annabel* eines oder mehrere Fragmente amplifiziert werden. Allerdings waren die amplifizierten Banden meist nicht besonders stark, so daß sie in Anbetracht der 40 PCR-Zyklen als Hintergrund betrachtet werden können. Es handelt sich vermutlich um schwache unspezifische Reaktionen. Jedoch ist auch nicht auszuschliessen, daß aufgrund mangelnder Homologie zwischen den verschiedenen Spezies die PCR-Primer nicht optimal an die Zielsequenz binden konnten.

Die beiden fischpathogenen Stämme mit starker AlaDH-Aktivität, *M.marinum* und *M.chelonae*, zeigten bei der PCR mit dem Primerpaar *Annabel* ein deutlich unterschiedliches Verhalten. Während *M.marinum* ein Produkt von etwa 540 bp lieferte, war bei den gewählten Bedingungen mit dem Primerpaar *Annabel* bei *M.chelonae* kein Fragment zu erhalten (Abb. 3.17, Bahn 9 und 10).

### 3.5.2.2 Das *AlaDH*-Gen des *M.tuberculosis* Complex

Da die Präsenz des Gens für die AlaDH nun in allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex nachgewiesen worden war, stellte sich die Frage, wie man sich die Diskrepanz zu den gemessenen Aktivitäten erklären sollte.

Aus diesem Grunde wurde damit begonnen größere Fragmente des Gens zu amplifizieren. Aus *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> konnten alle in Tab. 3.15 aufgeführten Fragmente amplifiziert werden (ein Teil dieser Fragmente ist in Abb. 3.18 gezeigt). Von den anderen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex sind ebenfalls alle PCR-Reaktionen aus Tab. 3.15 die ausprobiert wurden, positiv verlaufen. Es wurde jedoch nicht mit jedem Stamm jede Reaktion nachvollzogen.

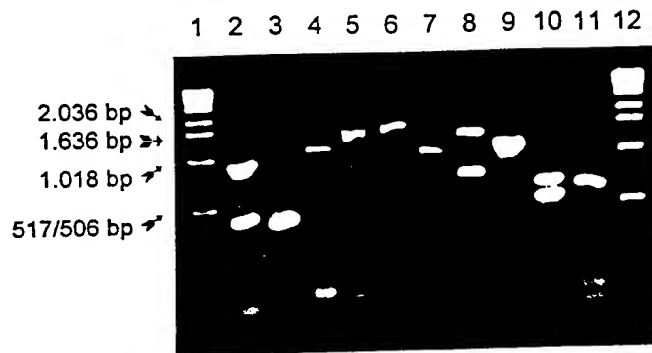


Abb. 3.18 : PCR-Produkte des Stammes *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>

Gefahren wurden bei diesen PCR's jeweils 40 Zyklen wie in Abb. 3.17 angegeben. Die *annealing*-Temperaturen sind, mit Ausnahme von Bahn 2 und 3, in Tab. 3.14 wiedergegeben. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration beim Primerpaar *Annabel* betrug 1,5 mM, die aller anderen Reaktionen 3 mM.

|                                |                   |
|--------------------------------|-------------------|
| Bahn 1 : KBL                   | Bahn 7 : Giselle  |
| Bahn 2 : <i>Annabel</i> , 65°C | Bahn 8 : Helen    |
| Bahn 3 : <i>Annabel</i> , 69°C | Bahn 9 : Isabelle |
| Bahn 4 : <i>Désirée</i>        | Bahn 10 : Larissa |
| Bahn 5 : <i>Eleonore</i>       | Bahn 11 : Melanie |
| Bahn 6 : <i>Francoise</i>      | Bahn 12 : KBL     |

Der von allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex amplifizierte Bereich umfasst 1260 bp. Er beinhaltet den kompletten kodierenden Abschnitt für die AlaDH, sowie weitere 75 bp *upstream* und 63 bp *downstream*. Dieser Bereich wurde von allen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex komplett durchsequenziert (Abb. 3.19). Lediglich bei den letzten etwa 20 Basen schleichen sich Ungenauigkeiten ein. Der komplette restliche Bereich ist jedoch durch mehrfache Sequenzierungen abgesichert.

Es ist festzustellen, daß sämtliche Sequenzen bis auf drei Stellen komplett mit der publizierten Sequenz der AlaDH des λAA65-Klons (Andersen *et al.*, 1992) identisch sind.

**Siehe Legende Seite 101.**

**Abb. 3.19 (2/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex**

**Siehe Legende Seite 101.**

|       |     |            |             |            |            |            |            |     |
|-------|-----|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| 40kD  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| Tub1  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| H37Rv | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| H37Ra | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| BCG4  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| BCG2  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| Bov3  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| Afr1  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| Mic1  | 541 | GCCGGCTACA | ACGCAGCCCCG | CATCGCCAAC | GGCATGGGCG | CGACCGTTAC | GGTTCTAGAC | 600 |
| ----- |     |            |             |            |            |            |            |     |
| 40kD  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| Tub1  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| H37Rv | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| H37Ra | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| BCG4  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| BCG2  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| Bov3  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| Afr1  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| Mic1  | 601 | ATCAACATCG | ACAAACTTCG  | GCAACTCGAC | GCCGAGTTCT | GCGGCCGGAT | CCCACTCGC  | 660 |
| ----- |     |            |             |            |            |            |            |     |
| 40kD  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| Tub1  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| H37Rv | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| H37Ra | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| BCG4  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| BCG2  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| Bov3  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| Afr1  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| Mic1  | 661 | TACTCATCGG | CCTACGAGCT  | CGAGGGTGCC | GTCAAACGTG | CCGACCTGGT | GATTGGGGCC | 720 |
| ----- |     |            |             |            |            |            |            |     |
| 40kD  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| Tub1  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| H37Rv | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| H37Ra | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| BCG4  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| BCG2  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| Bov3  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| Afr1  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| Mic1  | 721 | GTCCTGGTGC | CAGGCGCCAA  | GGCACCCAAA | TTAGTCTCGA | ATTCACTTGT | CGCGCATATG | 780 |
| ----- |     |            |             |            |            |            |            |     |
| 40kD  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| Tub1  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| H37Rv | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| H37Ra | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| BCG4  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| BCG2  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| Bov3  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| Afr1  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |
| Mic1  | 781 | AAACCAGGTG | CGGTACTGGT  | GGATATAGCC | ATCGACCAGG | GCGGCTGTTT | CGAAGGCTCA | 840 |

Abb. 3.19 (3/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

|       |      |            |            |             |            |            |            |      |
|-------|------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| 40kD  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| Tub1  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| H37Rv | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| H37Ra | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| BCG4  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| BCG2  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| Bov3  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| Afr1  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| Mic1  | 841  | CGACCGACCA | CCTACGACCA | CCCGACGTTT  | GCCGTGCACG | ACACGCTGTT | TTACTGCGTG | 900  |
| ----- |      |            |            |             |            |            |            |      |
| 40kD  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| Tub1  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| H37Rv | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| H37Ra | 90   | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| BCG4  | 90   | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| BCG2  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| Bov3  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| Afr1  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| Mic1  | 901  | GCGAACATGC | CCGCCTCGGT | GCCGAAGACG  | TCGACCTACG | CGCTGACCAA | CGCGACGATG | 960  |
| ----- |      |            |            |             |            |            |            |      |
| 40kD  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| Tub1  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| H37Rv | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| H37Ra | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| BCG4  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| BCG2  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| Bov3  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| Afr1  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| Mic1  | 961  | CCGTATGTGC | TCGAGCTTGC | CGACCATGGC  | TGGCGGGCGG | CGTGCCGGTC | GAATCCGGCA | 1020 |
| ----- |      |            |            |             |            |            |            |      |
| 40kD  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| Tub1  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| H37Rv | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| H37Ra | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| BCG4  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| BCG2  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| Bov3  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| Afr1  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| Mic1  | 1021 | CTAGCCAAAG | GTCTTTCGAC | GCACGAAGGG  | GCGTTACTGT | CCGAACGGGT | GGCCACCGAC | 1080 |
| ----- |      |            |            |             |            |            |            |      |
| 40kD  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| Tub1  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| H37Rv | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| H37Ra | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| BCG4  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| BCG2  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| Bov3  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| Afr1  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |
| Mic1  | 1081 | CTGGGGGTGC | CGTTCACCGA | GCCCCGCCAGC | GTGCTGGCCT | GA         | CTCTCGGC   | 1140 |

Abb. 3.19 (4/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Siehe Legende Seite 101.

|       |      |            |             |            |            |       |      |
|-------|------|------------|-------------|------------|------------|-------|------|
| 40kD  | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGG | CCGCG | 1185 |
| Tub1  | 1141 | GCCGAGCACA | CNTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGN | C     | 1185 |
| H37Rv | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGG | CCG   | 1185 |
| H37Ra | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGA       |       | 1185 |
| BCG4  | 1141 | GCCGANCA   | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGG | CC    | 1185 |
| BCG2  | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCNNGGAGT | AAGGGAAGCG | ATGATG     |       | 1185 |
| Bov3  | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGG | CC    | 1185 |
| Afr1  | 1141 | GCCGAGCNCA | CGTCG       |            |            |       | 1185 |
| Mic1  | 1141 | GCCGAGCACA | CGTCGGGAGT  | AAGGGAAGCG | ATGATGTCGG | CC    | 1185 |

Abb. 3.19 (5/5) : Alignment des AlaDH-Gens und den flankierenden Regionen aus verschiedenen Stämmen des *M.tuberculosis* Complex

Die mit "40kD" bezeichnete Zeile gibt die Sequenz von Andersen *et al.* (1992) wieder. Sequenzunterschiede sind jeweils mit einem "\*" über der Sequenz gekennzeichnet. Das Start- und das Stopcodon sind ebenfalls über der Sequenz markiert. Bei den fett gedruckten Basen am Ende der Sequenz handelt es sich um Sequenzierungsungenauigkeiten.

Die erste Stelle an der sich die Sequenzen unterscheiden ist Base -32, also *upstream* des Translations-Startsignals. Interessanterweise unterscheiden sich an dieser Stelle die in dieser Arbeit bestimmten Sequenzen von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> und H37R<sub>a</sub> von der Sequenz von Andersen und Mitarbeitern (Andersen *et al.*, 1992). Alle anderen Sequenzen die in dieser Arbeit untersucht wurden, einschließlich die des dritten getesteten Stammes von *M.tuberculosis*, stimmen mit der Sequenz von Andersen überein.

Dies ist insofern verwunderlich, als daß die ursprünglich publizierte Sequenz auf dem Klon einer  $\lambda$ gt11-Bank beruht, die aus dem Stamm *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> hergestellt worden war. Es wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob eventuell durch die PCR ein Fehler eingeführt worden war. Dies bestätigte sich jedoch nicht. Es könnte jedoch auch möglich sein, daß der in dieser Arbeit benutzte Stamm von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> einen anderen Ursprung hat als der von Andersen. Ähnliche kleine Varianzen sind auch bei verschiedenen Stämmen unterschiedlichen Ursprungs von *M.bovis* BCG bekannt.

An der zweiten Stelle unterscheiden sich alle Stämme des *M.tuberculosis* Complex von der publizierten Sequenz der AlaDH von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>. Es handelt sich um



die Region der Basen 38 bis 49. Innerhalb dieser zwölf Basen wird die Sequenz AATTCC- wiederholt, die Basen 44 bis 49 stellen also ein *direct repeat* der Basen 38 bis 43 dar. In allen acht sequenzierten Stämmen ist dieses Muster jedoch jeweils nur einmal zu finden. Es ist also davon auszugehen, daß sich bei der von Andersen *et al.* (1992) bestimmten Sequenz ein Sequenzierungs- oder Lesefehler eingeschlichen hat. Die Gensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ändert sich hierdurch folgendermaßen :

Andersen *et al.*, 1992 :

|                |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gensequenz     | A   | A | C   | G | A   | A | T   | T | C   | C | A   | A | T   | T | C | C | G | G | G | T | G |
| Proteinsequenz | Asn |   | Glu |   | Phe |   | Gln |   | Phe |   | Arg |   | Val |   |   |   |   |   |   |   |   |

Diese Arbeit :

|                |     |   |     |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |   |     |   |   |   |
|----------------|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|-----|---|---|---|
| Gensequenz     | A   | A | C   | G | A   | A | T | T | C | - | - | - | - | - | - | - | C   | G | G   | G | T | G |
| Proteinsequenz | Asn |   | Glu |   | Phe |   | - |   | - |   |   |   |   |   |   |   | Arg |   | Val |   |   |   |

Es handelt sich also effektiv um den 'Verlust' der beiden Aminosäuren Glutamin und Phenylalanin. Nach dieser Deletion setzt sich die Sequenz wie von Andersen *et al.* (1992) publiziert fort.

Dieser Sachverhalt wurde durch die N-terminale Sequenzierung des Proteins bestätigt. Weder im nativen Protein von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>, noch im rekombinanten Protein aus *E.coli*, waren die beiden Aminosäuren zu finden.

Bei der dritten unterschiedlichen Stelle handelt es sich um Base 272. An dieser Stelle befindet sich, mit der Ausnahme dreier Stämmen, ein Adeninrest. Bei diesen drei Stämmen, *M.bovis* und zwei Stämme von *M.bovis* BCG, ist diese Base deletiert. Diese Deletion führt zu einer Leserasterverschiebung, die den gesamten folgenden Teil des resultierenden Proteins betrifft. Durch diese Leserasterverschiebung tritt an den Basen

404 bis 406 ein *opal*-Stoppsignal auf. Damit ist das Produkt dieses Gens nur etwa ein Drittel so groß wie die funktionelle AlaDH der anderen Stämme.

Das entscheidende bei dieser dritten Abweichung in der Gensequenz ist die Tatsache, daß sie genau in den drei Stämmen auftritt, die keine AlaDH-Aktivität zeigen. *M.bovis* und *M.bovis* BCG sind die einzigen Stämme des *M.tuberculosis* Complex, die keine Aktivität zeigen. Alle anderen Stämme wurden als mäßig oder stark positiv klassifiziert. Die beobachtete Deletion ist also der Grund für das Fehlen einer funktionellen AlaDH. Da jedoch mit dem mAb HBT-10 auch nicht das verkürzte Protein nachgewiesen werden kann (das Epitop von HBT-10 liegt im Bereich vor der Leserasterverschiebung), ist davon auszugehen, daß das verkürzte Protein erst gar nicht, bzw. nur in sehr kleinen, mit dem mAb HBT-10 nicht detektierbaren, Mengen, produziert wird.

### 3.5.2.3 Das *AlaDH*-Gen von *M.marinum*

Außer den Mitgliedern des *M.tuberculosis* Complex, war es in erster Linie der Stamm *M.marinum*, bei dem bei der PCR mit dem Primerpaar *Annabel* ein Fragment gewonnen werden konnte (Abb. 3.17), das sich bei der späteren Sequenzierung als *AlaDH* erwies. Wie sich zeigen sollte war dies insofern ein Glücksfall, als daß die meisten anderen PCR's mit den Primerpaaren aus Tab. 3.15 keine, oder zumindest nicht die erwarteten, Fragmente mit diesem Stamm lieferten. Lediglich die PCR mit dem Primerpaar *Giselle* verlief ebenfalls positiv. Wie sich später herausstellte war der Grund hierfür die mangelnde Homologie zwischen den Genen innerhalb der verschiedenen Spezies.

```

                                50      60      70
Mar3                          AATTCCGGTTAGCGATCACCCCGGCCGGCG
                                |||||
H37Rv  TTCCGACCGAGACCAAAACAACGAATTCCAATTCCGGGTGGCCATCACCCCGGCCGGCG

                                80      90      100      110      120      130
Mar3  TCGCCGCCTTGACCAAGCGCGGCCACGAGGTGCTGATCCAGGCCGGTGCCGGAGAAGGCT
                                |||||
H37Rv  TCGCGGAATAACCCGTCGTGGCCATGAGGTGCTCATCCAGGCAGGTGCCGGAGAGGGCT

                                140      150      160      170      180      190
Mar3  CCGCCATCTCCGACGCCGACTTCAAGGCCCGCGGTGCCCAGCTGATCAGCACCGCCGACC
                                |||||
H37Rv  CGGCTATCACCGACGCGGATTTCAAGGCGGCAGGCGCGCAACTGGTCGGCACCGCCGACC

                                200      210      220      230      240      250
Mar3  AGGTGTGGGCGGATGCGGACCTGCTGCTCAAGGTCAAGGAACCGATCGAGTCCGAGTACG
                                |||||
H37Rv  AGGTGTGGGCGGACGCTGATTTATTGCTCAAGGTCAAAGAACCGATAGCGGCGGAATACG

                                260      270      280      290      300      310
Mar3  GCCGGCTGCGCCGGGGCCAGACCCTGTTACCTACCTGCACCTGGCCGCCTCGCGCCCCCT
                                |||||
H37Rv  GCCGCCTGCGACACGGGCAGATCTTGTTACGTTCTTGCAATTGGCCGCGTCACGTGCTT

                                320      330      340      350      360      370
Mar3  GCACCGATGCCCTGCTGAAGTCCGGCACCACGTCCATCGCCTACGAGACGGTGCAGACCG
                                |||||
H37Rv  GCACCGATGCGTTGTTGGATTCCGGCACCACGTCAATTGCCTACGAGACCGTCCAGACCG

                                380      390      400      410      420      430
Mar3  CCGACGGCGCATTGCCGCTGCTGGCCCCCATGAGCGAGGTGCGCCGGGCGCCTGTCCGCCC
                                |||||
H37Rv  CCGACGGCGCACTACCCCTGCTTGCCCCGATGAGCGAAGTCGCCGGTCTGACTCGCCGCCC

                                440      450      460      470      480      490
Mar3  AAGCTGGGGCCTACCACCTGATGCGCACCCACGGCGGTGCGGGCGTGCTGATGGGCGGCG
                                |||||
H37Rv  AGGTTGGCGCTTACCACCTGATGCGAACCCAAGGGGGCCGCGGTGTGCTGATGGGCGGGG

                                500      510      520      530      540      550
Mar3  TCCCCGGCGTCAAGCCTGCCGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCACGGCCGGATACAACG
                                |||||
H37Rv  TGCCCCGGCGTCAACCGGCCGACGTCGTGGTGATCGGCGCGGGCACCGCCGGCTACAACG

```

Abb. 3.20 (1/2): Alignment der AlaDH Gene von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>

Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=6). Ein "|" kennzeichnet ein identisches Basenpaar.

|       |  |     |     |     |     |     |
|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
|       | 560  | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 |
| Mar3  | CCGCCCGCGTCGCCAACGGCATGGGCGCGATGGTCACCGTGCTGGATGTCAACATCAACA |     |     |     |     |     |
| H37Rv | CAGCCCGCATCGCCAACGGCATGGGCGCGACCGTTACGGTTCTAGACATCAACATCGACA |     |     |     |     |     |
|       | 620  | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 |
| Mar3  | AGCTCCGCCAGATCGACGCGGAGTTCGGCGGTCGCGTCCGGACCCGCTACTCGTCGACCC |     |     |     |     |     |
| H37Rv | AACTTCGGCAACTCGACGCCGAGTTCGCGGCCGGATCCACACTCGCTACTCATCGGCCT  |     |     |     |     |     |
|       | 680  | 690 | 700 | 710 | 720 |     |
| Mar3  | TCGACCTCGAGGATGCGGCAGTCCACGCCGACATGGTGATCGGGGCCGTCCT         |     |     |     |     |     |
| H37Rv | ACGAGCTCGAGGTGCCGTCAAACGTGCCGACCTGGTGATTGGGGCCGTCCTGGTGCCAG  |     |     |     |     |     |

Abb. 3.20 (2/2): Alignment der *AlaDH* Gene von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>

Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=6). Ein "|" kennzeichnet ein identisches Basenpaar.

Insgesamt konnten 682 Basen dieses Gens bestimmt werden (Abb. 3.20), was etwa 60% des kompletten Gens ausmacht. Diese 682 Basen kodieren den N-terminalen Bereich des Proteins. Es fehlen lediglich die ersten 35 Basen nach dem Startcodon.

Der sequenzierte Abschnitt der *AlaDH* von *M.marinum* zeigt 80,4% Identität mit dem entsprechenden Abschnitt von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>. Die Sequenzunterschiede sind relativ gleichmäßig über den gesamten Abschnitt verteilt.

Das abgeleitete Peptid der *M.marinum* Gensequenz (Abb. 3.21) zeigt 85,3% Identität und 92,0% Ähnlichkeit mit dem Protein von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>. Homologien zu anderen Proteinen der Swiss Prot-Datenbank sind in Tab. 3.15 wiedergegeben (Stand : 9/1996, Release 33). Als Vergleich sei erwähnt, daß die *AlaDH* von *M.tuberculosis* 53% Identität zu den Enzymen von *B.sphaericus* und *B.stearothermophilus* aufweist (Andersen *et al.*, 1992). Bei der *AlaDH* von *M.marinum* ist eine Identität von 51% mit dem Enzym von *B.sphaericus* bzw. von 50% mit dem Enzym von *B.stearothermophilus* festzustellen (Tab. 3.15).

```

**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....**.....
Mar3   14  FRLAITPAGVAALTKRGHEVLIQAGAGEGSAISDADFKAAGAQLISTADQVWADADLLLK 73
H37Rv  14  FRVAITPAGVAELTRRGHEVLIQAGAGEGSAITDADFKAAGQLVGTADQVWADADLLLK 73

*****.***** ** .....***** ***** ***** ***** *****
Mar3   74  VKEPIESEYGRLLRGQTLFTYLHLAASRPCTDALLKSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123
H37Rv  74  VKEPIAAEYGRLLRHGQILFTFLHLAASRACTDALLDSGTTSIAYETVQTADGALPLLAPM 123

*****.***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
Mar3  134  SEVAGRLSAQAGAYHLMRTHGGRGVLMGGVPGVKPADVVVIGAGTAGYNAARVANGMGAM 183
H37Rv 134  SEVAGRLAAQVGAYHLMRTQGGRGVLMGGVPGVEPADVVVIGAGTAGYNAARIANGMGAT 183

*****.***** ***** ***** ***** ***** *****
Mar3  184  VTVLDVNINKLRQIDAEFGGRVTRYSSTLDLEDAAVHADMVIGAV 229
H37Rv 184  VTVLDINIDKLRQLDAEFCGRITRYSSAYELEGAVKRADLVIGAV 229

```

Abb. 3.21 : Alignment der AlaDH's von *M.marinum* und *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>

Ein "\*" zeigt eine identische, ein "." eine funktionell verwandte Aminosäuren an. Das Screening der Datenbank und das Alignment wurden mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchgeführt (Sensitivität ktup=2).

Tab. 3.15 : Proteine mit Homologie zur AlaDH von *M.marinum*

Die Swiss Prot - Datenbank wurde mit der FASTA-Software (<http://www.embl-ebi.ac.uk/>) durchsucht (Stand : 9/1996, Release 33).

| Protein | Organismus                    | Identität | Ähnlichkeit |
|---------|-------------------------------|-----------|-------------|
| AlaDH   | <i>M.tuberculosis</i>         | 85,3 %    | 92,0 %      |
| AlaDH   | <i>B.sphaericus</i>           | 50,9 %    | 69,0 %      |
| AlaDH   | <i>B.stearotherophilus</i>    | 50,0 %    | 67,7 %      |
| AlaDH   | <i>B.subtilis</i>             | 48,7 %    | 68,6 %      |
| PNT     | Rind, mitochondrial           | 33,7 %    | 51,4 %      |
| PNT     | <i>E.coli</i>                 | 30,7 %    | 50,0%       |
| PNT     | <i>Haemophilus influenzae</i> | 28,8 %    | 48,2 %      |

Als essentiell für die Bindung des Cofaktors der AlaDH von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub> werden die Aminosäurereste Gly165, Gly167, Gly170 und Asp198 betrachtet. Diese vier Aminosäurereste stellen ein Charakteristikum der  $\beta\alpha\beta$ -Sekundärstruktur von

NAD(H)-Bindungsstellen dar (Wierenga *et al.*, 1986; Bork & Grunwald, 1990). Im Enzym von *M.marinum*, genauso wie bei sämtlichen anderen AlaDH's in Tab. 3.14, sind diese vier Reste konserviert.

Der entsprechende Abschnitt des Epitops des mAb HBT-10 bei der AlaDH von *M.marinum* hat die Sequenz A I S D A D F K A A G, und unterscheidet sich damit lediglich an der dritten Stelle von der Sequenz von *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>. Aufgrund des in dieser Arbeit bestimmten Konsensus epitops des Antikörpers (Tab. 3.9), müsste dieser auch mit der AlaDH von *M.marinum* reagieren. Tatsächlich ist dieser Stamm auch der einzige, mit dem eine Kreuzreaktion beobachtet werden konnte (Andersen *et al.*, 1992). Die ermittelte Sequenz stimmt also auch mit dieser Beobachtung überein.

**AlaDH-Aktivität in Mykobakterien.** Die gemessenen AlaDH-Aktivitäten lassen einige interessante Beobachtungen bezüglich der Lebensweise der Organismen mit positiver Aktivität zu.

Die Stämme mit starker Aktivität sind allesamt pathogen. Interessant ist hierbei, daß zwei der vier in diese Gruppe fallenden Stämme pathogen für Fische sind (Austin & Austin, 1987). Alle beide, *M.marinum* und *M.chelonae*, können jedoch auch Menschen

infizieren (Wallace *et al.*, 1983; Johnston & Izumi, 1987). Im Gegensatz zur Tuberkulose lösen sie jedoch meist krankhafte Infektionen der oberen Hautschichten aus, die meist relativ unproblematisch zu behandeln sind.

*M.chelonae* ist ein vergleichsweise schnell wachsendes, nicht-chromogenes Bakterium. Infektionen beim Menschen treten oft als sekundäre Wundinfektionen nach Operationen auf (Cooper *et al.*, 1989). *M.marinum* ist ein langsam wachsender Organismus, der bei Wachstum an Licht ein gelbes Pigment bildet. In mehr als 50 wechselwarmen Spezies (Reptilien, Amphibien, Fische) wurden Infektionen mit *M.marinum* nachgewiesen (Clark & Shepard, 1963). Beim Menschen manifestiert sich das Bakterium meist im Ellbogen- oder Kniebereich.

Die beiden anderen Stämme mit stark-positiver AlaDH-Aktivität sind Vertreter des *M.tuberculosis* Complex. Es sind dies der Tuberkulose-Referenzstamm *M.tuberculosis* H37R<sub>v</sub>, sowie der Stamm *M.microti*, der als phylogenetisches Bindeglied zwischen *M.tuberculosis* und *M.bovis* betrachtet wird.

Bis auf *M.smegmatis* sind auch alle als mäßig-positiv klassifizierten Stämme pathogen. Der Großteil dieser Stämme umfasst klinische Isolate von *M.tuberculosis*. Pathogene Varianten von Tuberkulose-Stämmen scheinen also in der Regel AlaDH-Aktivität zu besitzen. Es wurden jedoch auch zwei Isolate gefunden, die keine AlaDH-Aktivität aufweisen. Der einzige nicht-pathogene Organismus mit AlaDH-Aktivität ist der schnell wachsende Stamm *M.smegmatis*. *M.smegmatis* weist sich jedoch durch eine ungewöhnlich starke NAD<sup>+</sup>-reduzierende Hintergrundaktivität aus, und ist deshalb sehr leicht von allen anderen Stämmen mit AlaDH-Aktivität zu unterscheiden. Desweiteren wurde im Stamm *M.smegmatis* 1-2c, ein mykobakterieller Expressionsstamm, keine AlaDH-Aktivität gefunden.



Innerhalb der 44 getesteten Mykobakterien-Stämme, und dies ist bei weitem der Großteil aller bekannten Stämme, ist deshalb die Folgerung erlaubt :

■ Ein langsam wachsendes Mykobakterium mit positiver AlaDH-Aktivität ist virulent.

Der Umkehrschluß dieser Feststellung ist jedoch falsch. Unter den Stämmen ohne AlaDH-Aktivität sind etliche virulente. Trotzdem kommt man nicht umhin eine, wenn auch nicht feste, Tendenz festzustellen, nach der die AlaDH-Aktivität mit steigender Pathogenität eines Stammes zunimmt. Insbesondere durch die Aktivitäten der verschiedenen Stämme von *M.tuberculosis* wird diese These unterstrichen. Die mit Abstand höchste Aktivität hat der Stamm H37R<sub>v</sub>, der als Referenzstamm für alle Tuberkulose-Laboratorien dient, und eine bekannt hohe Infektiosität besitzt. Ganz am Ende rangiert das avirulente Derivat von H37R<sub>v</sub>, der Stamm H37R<sub>a</sub>. Zwischen diesen beiden Polen rangieren die klinischen Tuberkulose-Isolate, die mal etwas mehr und mal etwas weniger Aktivität zeigen.

**Das AlaDH-Gen in Mykobakterien.** Das Gen für die Alanin Dehydrogenase konnte in allen untersuchten Stämmen des *M.tuberculosis* Complex und im Stamm *M.marinum* identifiziert werden.

Der entscheidene Punkt beim Vergleich der Sequenzen innerhalb des *M.tuberculosis* Complex ist die Deletion der Base 272, die bei den untersuchten Stämmen von *M.bovis* und *M.bovis* BCG zu einer Leserasterverschiebung und letztendlich zu einem verkürzten, nicht-funktionellen Protein führt. Bei diesen Stämmen ließ sich auch in Zellextrakten keine AlaDH-Aktivität nachweisen. Diese Daten stimmen auch mit den Ergebnissen von Andersen *et al.* (1992) überein, die in Southern Blots zwar Signale mit diesen Stämmen erhielten, aber in Western Blots kein Protein nachweisen konnten.

Durch die Amplifikation und Sequenzierung des Gens konnte in dieser Arbeit die Ursache hierfür gefunden werden. Es muß jedoch auch in Betracht gezogen werden,

daß noch weitere Änderungen in den regulatorischen Genabschnitten für das Fehlen des verkürzten Proteins verantwortlich sein können. Dies könnte eine Maßnahme der Zelle sein, keine Energie in ein nicht funktionsfähiges Protein zu investieren. Allgemein ist über regulatorische Gensequenzen bei Mykobakterien noch nicht viel bekannt (Dale & Patki, 1990; Gupta *et al.* 1993). Es scheint jedoch, daß, nach dem Prinzip von *Enhancern*, auch weiter weg gelegene Abschnitte die Genexpression nicht unerheblich beeinflussen können. Die für eine Einstellung der Produktion des Proteins nötigen Mutationen müssen also nicht zwangsläufig auf dem in dieser Arbeit sequenzierten Bereich liegen.

Das andere identifizierte *AlaDH*-Gen, jenes von *M.marinum*, ist auf DNA-Ebene deutlich unterschiedlich von den Genen des *M.tuberculosis* Complex. Immerhin vier von fünf Basen (80,4%) sind beim Vergleich dieser Sequenzen jedoch durchschnittlich noch identisch. Dieser Wert ist auf Proteinebene noch höher (85,3% Identität, 92,0% Ähnlichkeit). Da *AlaDH*-Aktivität jedoch auch in einer Reihe weiterer Spezies gefunden wurde, ist davon auszugehen, daß sich die entsprechenden Gene, mangels Homologie zu den benutzten Primern, bei den benutzten Bedingungen nicht amplifizieren ließen. Eine eingehendere Studie betreffs dieses Punktes müsste auch diese Gene auffinden können. Ein Vergleich all dieser Sequenzen könnte weitere Rückschlüsse auf die Rolle des Enzyms zulassen.

Desweiteren ist denkbar, daß sich anhand eines solchen Sequenzvergleiches ein PCR-Verfahren entwickeln lassen müsste, mit dem man Mykobakterien, die ein *AlaDH*-Gen besitzen, voneinander unterscheiden kann. Und wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind es eben die für den Menschen bedeutenden Stämme, die ein *AlaDH*-Gen besitzen. Besonders die Möglichkeit, mit einem solchen PCR-Assay den Erreger *M.tuberculosis* vom Impfstamm *M.bovis* BCG unterscheiden zu können, lassen ein solches Vorhaben interessant erscheinen.

**Ausblick.** Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen stellt in mehrererlei Hinsicht ein lohnenswertes Objekt für weitergehende Untersuchungen dar. Ein Punkt, der in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt wurde, ist die mögliche Anwendung dieses Enzyms in der medizinischen Diagnostik. So wurden bereits für die Enzyme Dipeptidase (Ito *et al.*, 1984),  $\gamma$ -Glutamyltransferase (Kondo *et al.*, 1992) und  $\gamma$ -Glutamyl Cyclotransferase (Takahashi *et al.*, 1987) Assays beschrieben, die auf einer AlaDH basieren. Alle drei genannten Enzyme sind bei verschiedenen Krankheiten in veränderten Urin-, Serum- bzw. Blutkonzentrationen vorzufinden.

Das Hauptaugenmerk liegt jedoch auf dem Einsatz des 40 kD-Antigens bei der Tuberkulose. Ansatzpunkte sind hierbei an mehreren Stellen denkbar.

Allein bei der Diagnostik sind mehrere Möglichkeiten vorstellbar, wie das 40 kD-Antigen, bzw. das ihm zugrundeliegende Gen, genutzt werden könnte. Da das rekombinante Protein nun leicht aus dem überproduzierenden *E.coli* Stamm gewonnen werden kann, erscheint es lohnenswert, die Nützlichkeit dieses Proteins in der Serologie zu überprüfen. Zudem könnten sich diagnostische Verfahren entwickeln lassen, die auf dem direkten Nachweis von AlaDH-Aktivität oder, wie bereits erwähnt, auf der Amplifikation spezifischer Teile des Gens beruhen. Die Deletion der Base 272 in den Stämmen *M.bovis* und *M.bovis* BCG kann hierbei als Ansatzpunkt der Diskriminierung dieser beiden Stämme von *M.tuberculosis* dienen.

Ein PCR-Assay müsste sich auch für den Stamm *M.marinum* etablieren lassen, der sich ja auf Genebene nicht unerheblich vom *M.tuberculosis* Complex unterscheidet. Bislang wird zu diesem Zweck ein PCR-Assay, beruhend auf der Amplifikation eines Teils der für die 16S rRNA kodierenden Gensequenz, eingesetzt (Knibb *et al.*, 1993). Dies ist, in Anbetracht der in den letzten Jahren steigenden Zahl von Infektionen mit *M.marinum* in Fischfarmen (Knibb *et al.*, 1993), von großer Bedeutung. Auch Infektionen beim Menschen werden in den letzten Jahren gehäuft gemeldet (Harris *et al.*, 1991; Kullavanijaya *et al.*, 1993; Slosarek *et al.*, 1994).

Die Beobachtung, daß die Virulenz eines Stammes von *M.tuberculosis* sehr gut mit seiner AlaDH-Aktivität korreliert, wirft erneut die Frage auf, ob das Enzym einen

Virulenzfaktor darstellt. Zur Beantwortung dieser Frage sind Ansätze denkbar, wie der *knock-out* des Gens in *M.tuberculosis* oder die Überexpression des Gens in einem Stamm mit niedriger Virulenz. In beiden Fällen kann die Virulenz im Tiermodell überprüft werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aharonowitz Y. & Friedrich C.G. (1980). Alanine Dehydrogenase of the  $\beta$ -Lactam Antibiotic Producer *Streptomyces clavuligerus*. Arch.Microbiol. **125**, 137-142.
- Alizade M.A.; Bressler R. & Brendel K. (1975). Stereochemistry of the Hydrogen Transfer to NAD<sup>+</sup> Catalyzed by (S)Alanine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. Biochim.Biophys.Acta **397**, 5-8.
- Amicosante M.; Barnini S.; Corsini V.; Paone G.; Read Jr. C.A.; Tartoni P.L.; Singh M.; Albera C.; Bisetti A.; Senesi S.; Campa M. & Saltini C. (1996). Evaluation of a Novel Tuberculosis Complex-Specific 34 kDa Protein in the Serological Diagnosis of Tuberculosis. Europ.Respir.J., im Druck.
- Andersen A.B.; Worsaae A. & Chaparas S.D (1988). Isolation and Characterization of Recombinant  $\lambda$ gt11 Bacteriophages Expressing Eight Different Mycobacterial Antigens of Potential Immunological Relevance. Infect.Immun. **56**, 1344-1351.
- Andersen A.B. & Hansen E.B. (1989). Structure and Mapping of Antigenic Domains of Protein Antigen b, a 38,000-Molecular-Weight Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect.Immun. **57**, 2481-2488.
- Andersen P.; Askgaard D.; Ljungqvist L.; Bennedsen J. & Heron I. (1991). Proteins Released from *Mycobacterium tuberculosis* during Growth. Infect.Immun. **59**, 1905-1910.
- Andersen A.B.; Andersen P. & Ljungqvist L. (1992). Structure and Function of a 40,000 - Molecular - Weight Protein Antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **60**, 2317-2323.
- Andersen P. (1994). Effective Vaccination of Mice against *Mycobacterium tuberculosis* Infection with a Soluble Mixture of Secreted Mycobacterial Proteins. Infect.Immun. **62**, 2536-2544.
- Anthony L.S.D.; Chatterjee D.; Brennan P.J. & Nano F.E. (1994). Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* Modulates the Generation of Reactive Nitrogen Intermediates by  $\gamma$ -Interferon-Activated Macrophages. FEMS Immunol.Med. Microbiol. **8**, 299-305.
- Armstrong J.A. & Hart P.D. (1971). Response of Cultured Macrophages to *M.tuberculosis* with Observations on Fusion of Lysosomes with Phagosomes. J.Exp.Med. **134**, 713-740.

- Arruda S.; Bomfim G.; Knights R.; Huima-Byron T. & Riley L.W. (1993). Cloning of an *M.tuberculosis* DNA Fragment Associated with Entry and Survival Inside Cells. *Science* **261**, 1454-1457.
- Arya S.C.; Sada E.; Aquilar D.; Torres M. & Herrera T. (1993). Serologic Diagnosis of Tuberculosis through Assays of Lipoarabinomannan Antigen or Antibody or Lysozyme Level. *J.Clin.Microbiol.* **31**, 2836-2838.
- Austin B. & Austin D.A. (1987). *Bacterial Fish Pathogens - Disease in Farmed and Wild Fish*. Chapter 7 : Aerobic Gram-Positive Rods. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Azuma I.; Thomas D.W.; Adam A.; Ghuysen J.M.; Bonaly R.; Petit J.F. & Lederer E. (1970). Occurrence of *N*-Glycolylmuramic Acid in Bacterial Cell Walls. *Biochim.Biophys.Acta.* **208**, 444-451.
- Babior B.M.; Kipnes R.S. & Curnutte J.T. (1973). Biological Defense Mechanism: the Production by Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. *J.Clin.Invest.* **52**, 741-744.
- Baehner R.L. & Nathan D.G. (1968). Quantitative Nitroblue Tetrazolium Test in Chronic Granulomatous Disease. *New Engl.J.Med.* **278**, 971-976.
- Banerjee A.; Dubnau E.; Quémard A.; Balasubramanian V.; Um K.S.; Wilson T.; Collins D.; de Lisle G. & Jacobs Jr. W.R. (1994). *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**, 227-230.
- Barksdale L. & Kim K.S. (1977). *Mycobacterium*. *Bacteriol.Rev.* **41**, 217-372.
- Barnes P.F.; Bloch A.B.; Davidson P.T. & Snider Jr. D.E. (1991). Tuberculosis in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *New Engl.J.Med.* **324**, 1644-1650.
- Barrera L.F.; Kramnik I.; Skamene E. & Radzioch D. (1994). Nitrite Production by Macrophages Derived from BCG-Resistant and -Susceptible Congenic Mouse Strains in Response to IFN- $\gamma$  and Infection with BCG. *Immunology* **82**, 457-464.
- Bass Jr. J.B.; Farer L.S.; Hopewell P.C.; Jacobs R.F. & Snider Jr. D.E. (1990). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis. *Am.Rev.Resp.Dis.* **142**, 725-735.
- Beige J.; Lokies J.; Schaberg T.; Finckh U.; Fischer M.; Mauch H.; Lode H.; Köhler B. & Rolfs A. (1995). Clinical Evaluation of a *Mycobacterium tuberculosis* PCR Assay. *J.Clin.Microbiol.* **33**, 90-95.

- Bellion E. & Tan F. (1987). An NAD<sup>+</sup>-Dependent Alanine Dehydrogenase from a Methylophilic Bacterium. *Biochem.J.* **244**, 565-570.
- Berberich R.; Kaback M. & Freese E. (1968). D-Amino Acids as Inducers of L-Alanine Dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *J.Biol.Chem.* **243**, 1006-1011.
- Bermudez L.E.; Young L.S.; Martinelli J & Petrofsky M. (1993). Exposure to Ethanol Up-Regulates the Expression of *Mycobacterium avium* Complex Proteins Associated with Bacterial Virulence. *J.Infect.Dis.* **168**, 961-968.
- Bjerrum O.J. & Schafer-Nielsen C. (1986). Buffer Systems and Transfer Parameters for Semidry Electroblotting with a Horizontal Apparatus. In: Electrophoresis '86, Proceedings of the Fifth Meeting of the International Electrophoresis Society - London 1986. (Ed. M.J.Dunn) VCH, Weinheim.
- Black W.J.; Quinn F.D. & Tompkins L.S. (1990). *Legionella pneumophila* Zinc Metalloprotease Is Structurally and Functionally Homologous to *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *J.Bacteriol.* **172**, 2608-2613.
- Bloom B.R. & Murray C.J.L (1992). Tuberculosis : Commentary on a Reemergent Killer. *Science* **257**, 1055-1064.
- Boesen H.; Jensen B.N.; Wilcke T. & Andersen P. (1995). Human T-Cell Responses to Secreted Antigen Fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **63**, 1491-1497.
- Böhme H.J.; Koppenschläger G.; Schulz J. & Hofmann E. (1972). Affinity Chromatography of Phosphofructokinase Using Cibacron Blue F3G-A. *J.Cromatogr.* **69**, 209-241.
- Bork P. & Grunwald C. (1990). Recognition of Different Nucleotide-Binding Sites in Primary Structures Using a Property-Pattern Approach. *Eur.J.Biochem.* **191**, 347-358.
- Bothamley G.H. & Rudd R.M. (1994). Clinical Evaluation of a Serological Assay Using a Monoclonal Antibody (TB72) to the 38 kDa Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur.Respir.J.* **7**, 240-246.
- Bowe F. & Heffron F. (1994). Isolation of Salmonella Mutants Defective for Intracellular Survival. *Methods Enzymol.* **236**, 509-526.
- Bradford M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.

- Bragg P.D.; Davies P.L. & Hou C. (1972). Function of Energy-Dependent Transhydrogenase in *Escherichia coli*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **47**, 1248-1255.
- Brennan P.J. & Nikaido H. (1995). The Envelope of Mycobacteria. *Annu.Rev.Biochem.* **64**, 29-63.
- Buchmeier N.A. & Heffron F. (1989). Intracellular Survival of Wild-Type *Salmonella typhimurium* and Macrophage-Sensitive Mutants in Diverse Populations of Macrophages. *Infect.Immun.* **57**, 1-7.
- Buchmeier N.A. & Heffron F. (1990). Induction of Salmonella Stress Proteins upon Infection of Macrophages. *Science* **248**, 730-732.
- Buchmeier N.A.; Lipps C.J.; So M.Y.H. & Heffron F. (1993). Recombinant-Deficient Mutants of *Salmonella typhimurium* Are Virulent and Sensitive to the Oxidative Burst of Macrophages. *Mol.Microbiol.* **7**, 933-936.
- Buchmeier N.A.; Libby S.J.; Xu Y.; Loewen P.C.; Switala J.; Guiney D.G. & Fang F.C. (1995). DNA Repair Is More Important than Catalase for Salmonella Virulence in Mice. *J.Clin.Invest.* **95**, 1047-1053.
- Caballero F.J.; Cardenas J. & Castillo F. (1989). Purification and Properties of L-Alanine Dehydrogenase of the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *J.Bacteriol.* **171**, 3205-3210.
- Calmette A. (1927). La Vaccination Preventive Contra la Tuberculose par BCG. Masson, Paris.
- Camilli A.; Goldfine H. & Portnoy D.A. (1991). *Listeria monocytogenes* Mutants Lacking Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Are Avirulent. *J.Exp.Med.* **173**, 751-754.
- Chan J.; Fan X.; Hunter S.W.; Brennan P.J. & Bloom B.R. (1991). Lipoarabinomannan, a Possible Virulence Factor Involved in Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages. *Infect.Immun.* **59**, 1755-1761.
- Chan J.; Tanaka K.; Carroll D.; Flynn J. & Bloom B.R. (1995). Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Murine Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **63**, 736-740.
- Chang Z.; Choudhary A.; Lathigra R. & Quiocho F.A. (1994). The Immunodominant 38-kDa Lipoprotein Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Phosphate-binding Protein. *J.Biol.Chem.* **269**, 1956-1958.



- Chatterjee D.; Roberts A.D.; Lowell K.; Brennan P.J. & Orme I.M. (1992). Structural Basis of Capacity of Lipoarabinomannan to Induce Secretion of Tumor Necrosis Factor. *Infect.Immun.* **60**, 1249-1253.
- Cherayil B.J. & Young R.A. (1988). A 28-kDa Protein from *Mycobacterium leprae* Is a Target of the Human Antibody Response in Lepromatous Leprosy. *J.Immunol.* **141**, 4370-4375.
- Choudhary A.; Vyas M.N.; Vyas N.K.; Chag Z. & Quiocho F.A. (1994). Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Analysis of the 38-kDa Immunodominant Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteine Science* **3**, 2450-2451.
- Clark H.F. & Shepard C.C. (1963). Effect of Environmental Temperatures on Infection with *Mycobacterium marinum* (*balnei*) of Mice and a Number of Poikilothermic Species. *J.Bacteriol.* **86**, 1057-1069.
- Clemens D.L & Horwitz M.A. (1995). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome and Evidence that Phagosomal Maturation Is Inhibited. *J.Exp.Med.* **181**, 257-270.
- Cooksey R.C. & Crawford J.T. (1994). Detection of the 10-kD Antigen Structural Gene in Mycobacteria by Using the Polymerase Chain Reaction. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **18**, 215-218.
- Cooper J.F.; Lichtenstein M.J.; Graham B.S. & Schaffner W. (1989). *Mycobacterium chelonae* : A Cause of Nodular Skin Lesions with a Proclivity for Renal Transplant Recipients. *Am.J.Med.* **86**, 173-177.
- Crowle A.J.; Dahl R.; Ross E. & May M.H. (1991). Evidence that Vesicles Containing Living, Virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in Cultured Human Macrophages Are Not Acidic. *Infect.Immun.* **59**, 1823-1831.
- Dahlgren C.; Follin P.; Lundqvist H. & Sjölin C. (1993). Quantitative Slot-Blot Chemiluminescence Assay for Determination of Myeloperoxidase from Human Granulocytes. *Anal.Biochem.* **214**, 284-288.
- Dale J.W. & Patki A. (1990). Mycobacterial Gene Expression and Regulation. In : Molecular Biology of the Mycobacteria. (Ed. J.McFadden) Surrey University Press, London.
- Damaschke K. (1996). Das rekombinante 38KD Antigen von M.tuberculosis : Konstruktion und Aufreinigung von Deletionsderivaten, sowie deren biochemische und immunologische Charakterisierung. Dissertation, Universität Braunschweig.
- Damiani G.; Kiyotaki C.; Soeller W.; Sasada M.; Peisach J. & Bloom B.R. (1980). Macrophage Variants in Oxygen Metabolism. *J.Exp.Med.* **152**, 808-822.

- Delforge D.; Depiereux E.; De Bolle X.; Feytmans E. & Remacle J. (1993). Similarities Between Alanine Dehydrogenase and the N-Terminal Part of Pyridine Nucleotide Transhydrogenase and their Possible Implication in the Virulence Mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **190**, 1073-1079.
- Deshpande R.G.; Khan M.B.; Bhat D.A. & Navalkar R.G. (1994). Isolation of a 43 kDa Protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Its Identification as a Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. *J.Appl.Bacteriol.* **77**, 639-643.
- Dessen A.; Quermard A.; Blanchard J.S.; Jacobs Jr. W.R.; Sacchettini J.C. (1995). Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **267**, 1638-1641.
- Ding A.H.; Nathan C.F. & Stuehr D.J. (1988). Release of Reactive Nitrogen Intermediates and Reactive Oxygen Intermediates from Mouse Peritoneal Macrophages - Comparison of Activating Cytokines and Evidence for Independent Production. *J.Immunol.* **141**, 2407-2412.
- Dramsı S.; Lebrun M. & Cossart P. (1996). Molecular and Genetic Determinants Involved in Invasion of Mammalian Cells by *Listeria monocytogenes*. Band 209 : Current Topics in Microbiology and Immunology (Eds. Compans R.W.; Cooper M.; Koprowski H.; Melchers F.; Oldstone M.; Olsnes S.; Potter M.; Saedler H.; Vogt P.K. & Wagner H.) Springer, Berlin.
- van Eden W.; Thole J.E.; van der Zee R.; Noordzij A.; van Embden J.D.; Hensen E.J. & Cohen I.R. (1988). Cloning of the Mycobacterial Epitope Recognized by T Lymphocytes in Adjuvant Arthritis. *Nature* **331**, 171-173.
- El-Awamry Z.A. & El-Rahmany T.A. (1989). Partial Purification and Properties of *Cunninghamella elegans* L-Alanine Dehydrogenase. *Zentralbl.Mikrobiol.* **144**, 231-240.
- Elsinghorst E.A. (1994). Measurement of Invasion by Gentamicin Resistance. *Methods Enzymol.* **236**, 405-420.
- d'Esopo N.D. (1982). Clinical Trials in Pulmonary Tuberculosis. *Am.Rev.Resp.Dis.* **125**, 85-93.
- Espitia C.; Elinos M.; Hernandez-Pando R. & Mancilla R. (1992). Phosphate Starvation Enhances Expression of the Immunodominant 38-Kilodalton Protein Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* : Demonstration by Immunogold Electron Microscopy. *Infect.Immun.* **60**, 2998-3001.

- Falcone V.; Bassey E.; Jacobs Jr. W.; Collins F. (1995). The Immunogenicity of Recombinant *Mycobacterium smegmatis* Bearing BCG Genes. *Microbiology* **141**, 1239-1245.
- Ferebee S.H. (1970). Controlled Chemoprophylaxis Trials in Tuberculosis - A General Review. *Adv.Tuberc.Res.* **17**, 28-106.
- Fields P.I.; Swanson R.V.; Haidaris C.G. & Heffron F. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot Survive within the Macrophage Are Avirulent. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **83**, 5189-5193.
- Fields P.I.; Groisman E.A. & Heffron F. (1989). A *Salmonella* Locus that Controls Resistance to Microbicidal Proteins from Phagocytic Cells. *Science* **243**, 1059-1062.
- Fine P.E.M. (1989). The BCG Story: Lessons from the Past and Implications for the Future. *Rev.Inf.Dis.* **11 Supp.2**, 353-359.
- Flores M.E. & Sánchez S. (1989). Ammonium-Assimilating Enzymes and Erythromycin Formation in *Saccharolypospora erythrea*. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **35**, 203-211.
- Frank R. (1992). Spot-Synthesis : An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron* **48**, 9217-9232.
- Frankel A.D. & Jones R.F. (1980). Changes in Enzyme Activity During Differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim.Biophys.Acta* **630**, 157-164.
- Galán J.E. & Curtiss R. (1990). Expression of *Salmonella typhimurium* Genes Required for Invasion Is Regulated by Changes in DNA Supercoiling. *Infect.Immun.* **58**, 1879-1885.
- Garbe T.; Harris D.; Vordermeier M.; Lathigra R.; Ivanyi J. & Young D. (1993). Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton Antigen in *Mycobacterium smegmatis* : Immunological Analysis and Evidence of Glycosylation. *Infect.Immun.* **61**, 260-267.
- Garbe T.R.; Barathi J.; Barnini S.; Zhang Y.; Abou-Zeid C.; Tang D.; Mukherjee R. & Young D.B. (1994). Transformation of a Range of Mycobacterial Species using Hygromycin as Selectable Marker. *Mol.Microbiol.* **140**, 133-138.
- del Giudice G. (1994). Hsp70: a Carrier Molecule with Built-In Adjuvanticity. *Experientia* **50**, 1061-1066.

- Goldman D.S. (1958). Enzyme Systems in the Mycobacteria, V. The Pyruvic Dehydrogenase System. *Biochim.Biophys.Acta* **27**, 513-518.
- Goldman D.S. (1959). Enzyme Systems in the Mycobacteria, VII. Purification, Properties and Mechanism of Action of the Alanine Dehydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* **34**, 527-539.
- Good R.C. (1992). The Genus *Mycobacterium* - Medical. In : The Procaryotes, Vol.II, 2nd Ed. (Ed. A.Balows; H.G.Trüper; M.Dworkin; W.Harder & K.H.Schleifer), Springer, New York.
- Gordon A.H. & d'Arcy Hart P., (1994). Stimulation or Inhibiton of the Respiratory Burst in Cultured Macrophages in a Mycobacterium Model : Initial Stimulation Is Followed by Inhibiton after Phagocytosis. *Infect.Immun.* **62**, 4650-4651.
- Goren M.B.; Cernich M. & Brokl O. (1978). Some Observations on Mycobacterial Acid-Fastness. *Am.Rev.Respi.Dis.* **118**, 151-154.
- Gottesman M.E.; Adhya S. & Das A. (1980). Transcription Antitermination by Bacteriophage Lambda *N* Gene Product. *J.Mol.Biol.* **140**, 57-75.
- Gottlieb M. & Chavko M. (1987). Silver Stain of Native and Denatured Eucaryotic DNA in Agarose Gels. *Anal.Biochem.* **165**, 33-37.
- Greenberg S.S.; Xie J.; Kolls J.; Mason C. & Didier P. (1995). Rapid Induction of mRNA for Nitric Oxide Synthase II in Rat Alveolar Macrophages by Intratracheal Administration of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **209**, 46-53.
- di Guan C.; Li P.; Riggs P.D. & Inouye H. (1987). Vectors that Faciliate the Expression and Purification of Foreign Peptides in *Escherichia coli* by Fusion to Maltose-Binding Protein. *Gene* **67**, 21-30.
- Gupta S.K.;Bashyam M.D. & Tyagi A.K. (1993). Cloning and Assessment of Mycobacterial Promoters by Using a Plasmid Shuttle Vector. *J.Bacteriol.* **175**, 5186-5192.
- Gupta S. & Tyagi A.K. (1993). Sequence of a Newly Identified *Mycobacterium tuberculosis* Gene Encoding a Protein with Sequence Homology to Virulence-Regulating Proteins. *Gene* **126**, 157-158.
- Haff L. & Easterday R.L. (1992). In: Theory and Practice in Affinity Chromatography (Eds. F.Eckstein & P.V.Sundaram) Academic Press, New York.

- Hanahan D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hanano R. & Kaufmann S.H.E. (1995). Nitric Oxide Production and Mycobacterial Growth Inhibition by Murine Alveolar Macrophages: the Sequence of rIFN- $\gamma$  stimulation and *Mycobacterium bovis* BCG Infection Determines Macrophage Activation. *Immunol.Lett.* **45**, 23-27.
- Harboe M. (1992). The Significance of Proteins Actively Secreted by *Mycobacterium tuberculosis* in Relation to Immunity and Complications of Mycobacterial Diseases. *Int.J.Leprosy* **60**, 470-476.
- Harris L.F.; Striplin W.H. & Burnside R.C. (1991). Aquatic Hazard *Mycobacterium marinum* Infection. *Ala.Med.* **61**, 8-10.
- Harth G.; Clemens D.L. & Horwitz M.A. (1994). Glutamine Synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: Extracellular Release and Characterization of its Enzymatic Activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **91**, 9342-9336.
- Hartmans S. & de Bont J.A.M. (1992). The Genus *Mycobacterium* - Nonmedical. In : The Procaryotes, Vol.II, 2nd Ed. (Ed. A.Balows; H.G.Trüper; M.Dworkin; W.Harder & K.H.Schleifer), Springer.
- Haslov K.; Andersen A.; Nagai S.; Gottschau A.; Sorensen T. & Andersen P. (1995). Guinea Pig Cellular Immune Response to Proteins Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **63**, 804-810.
- l'Herminez R.H. (1993). Urgent Need for a New Approach to the Diagnosis of Tuberculosis in Developing Countries in the Decade of AIDS. *Trop.Geograph.Med.* **45**, 145-149.
- Heym B.; Zhang Y.; Poulet S.; Young D. & Cole S.T. (1993). Characterization of the *katG* Gene Encoding a Catalase-Peroxidase Required for the Isoniazid Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Bacteriol.* **175**, 4255-4259.
- Hodgson A.L.M.; Krywult J.; Corner L.A.; Rothel J.S. & Radford A.J. (1992). Rational Attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* : Cheesy Gland Vaccine and Live Delivery Vehicle. *Infect.Immun.* **60**, 2900-2905.
- Honorat A.; Monot F. & Ballerini D. (1990). Synthesis of L-Alanine and L-Valine by Enzyme Systems from *Bacillus megaterium*. *Enzyme Microb.Technol.* **12**, 515-520.

- Horwitz M.A.; Lee B.W.E.; Dillon B.J. & Harth G. (1995). Protective Immunity against Tuberculosis Induced by Vaccination with Major Extracellular Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc.Natl.Acad.Sci. 92, 1530-1534.
- Huebner R.E.; Schein M.F. & Bass Jr. J.B. (1993). The Tuberculin Skin Test. Clin.Inf.Dis. 17, 968-975.
- Hughes A.L. (1993). Contrasting Evolutionary Rates in the Duplicate Chaperonin Genes of *Mycobacterium tuberculosis* and *M.leprae*. Mol.Biol.Evol. 10, 1343-1359.
- Hutter B. (1994). Expression, Aufreinigung und Charakterisierung des 40 kD-Antigens von *Mycobacterium tuberculosis*. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Huygen K. Content J.; Denis O.; Montgomery D.L.; Yawman A.M.; Deck R.R.; deWitt C.M.; Orme I.M.; Baldwin S.; d'Souza C.; Drowart A.; Lozes E.; Vandenbussche P.; van Vooren J.P.; Liu M.A. & Ulmer J.B. (1996). Immunogenicity and Protective Efficacy of a Tuberculosis DNA Vaccine. Nature Medicine 2, 893-898.
- Inagaki K.; Tanizawa K.; Badet B.; Walsh C.T.; Tanaka H. & Soda K. (1986). Thermostable Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus* : Molecular Cloning of the Gene, Enzyme Purification and Characterization. Biochemistry 25, 3268-3274.
- Isacsson U. & Wettermark G. (1974). Chemiluminescence in Analytical Chemistry. Anal.Chim.Acta 68, 339-362.
- Isberg R.R. & van Nhieu G.T. (1994). Two Mammalian Cell Internalization Strategies Used by Pathogenic Bacteria. Annu.Rev.Genet. 27, 395-422.
- to Y.; Watanabe Y.; Hirano K.; Sugiura M.; Sawaki S. & Ogiso T. (1984). A Fluorometric Method for Dipeptidase Activity Measurementn in Urine, Using L-Alanyl-L-Alanine as Substrate. J.Biochem. 96, 1-8.
- to N. & Morikawa R. (1983). Crystallization and Properties of L-Alanine Dehydrogenase from *Streptomyces phaeochromogenes*. Agric.Biol.Chem. 47, 2511-2519.
- Jackson J.B. (1991). The Proton-Translocating Nicotinamide Adenine Dinucleotide Transhydrogenase. J.Bioenerg.Biomembr. 23, 715-741.

- Jarlier V. & Nikaido H. (1994). Mycobacterial Cell Wall : Structure and Role in Natural Resistance to Antibiotics. FEMS Microbiol.Lett. **123**, 11-18.
- Johansen K.A.; Gill R.E. & Vasil M.L. (1996). Biochemical and Molecular Analysis of Phospholipase C and Phospholipase D Activity in Mycobacteria. Infect. Immun. **64**, 3259-3266.
- Johnston J.M & Izumi A.K. (1987). Cutaneous *Mycobacterium marinum* Infection ("Swimming Pool Granuloma"). Clin.Dermatol. **5**, 68-75.
- Jones S. & Portnoy D.A. (1994). Intracellular Growth of Bacteria. Methods Enzymol. **236**, 463-467.
- Kadival G.V.; Chaparas S.D. & Hussong D. (1987). Characterization of Serologic and Cell-Mediated Reactivity of a 38-kDa Antigen Isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. J.Immunol. **139**, 2447-2451.
- Kamayama S.; Sato H. & Murata R. (1974). The Role of Alpha Toxin of *Clostridium perfringens* in Experimental Gas Gangrene in Guinea Pigs. Jpn.J.Med.Sci.Biol. **25**, 200-211.
- Kapmeyer H.; Pfeleiderer G. & Trommer W.E. (1976). A Transition State Analogue for Two Pyruvate Metabolizing Enzymes, Lactate Dehydrogenase and Alanine Dehydrogenase. Biochemistry, **15**, 5024-5028.
- Kato K.; Strominger J.L. & Kotani S. (1968). Structure of the Cell-Wall of *Corynebacterium diphtheriae*. I. Mechanism of Hydrolysis by the L-3 Enzyme and the Structure of the Peptide. Biochemistry **7**, 2762-2773.
- Keradjopoulos D. & Holldorf A.W. (1980). Salt Dependent Changes of Alanine Dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*. FEBS Letters, **112**, 183-185.
- Keradjopoulos D. & Wulff K. (1974). Thermophilic Alanine Dehydrogenase from *Halobacterium salinarium*. Can.J.Biochem. **52**, 1033-1037.
- Khanolkar-Young S.; Kolk A.H.J.; Andersen A.B.; Bennedsen J.; Brennan P.J.; Rivoire B.; Kuijper S.; McAdam K.P.W.J.; Abe C.; Batra H.V.; Chaparas S.D.; Damiani G.; Singh M. & Engers H.D. (1992). Results of the Third Immunology of Leprosy / Immunology of Tuberculosis Antimycobacterial Monoclonal Antibody Workshop. Infect.Immun. **60**, 3925-7.

- Kim E.K. & Fitt P.S. (1977). Partial Purification and Properties of *Halobacterium cutirubrum* L-Alanine Dehydrogenase. *Biochem.J.* **161**, 313-320.
- Klebanoff S.J. (1980). Oxygen Metabolism and the Toxic Properties of Phagocytes. *Annals Intern.Med.* **93**, 480-489.
- Knibb W.; Colorni A.; Ankaoua M.; Lindell D.; Diamant A. & Gordin H. (1993). Detection and Identification of a Pathogenic Marine Mycobacterium from the European Seabass *Dicentrarchus labrax* Using Polymerase Chain Reaction and Direct Sequencing of 16S rDNA Sequences. *Mol.Mar.Biol.Biotechnol.* **2**, 225-232.
- Koch R. (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl.Klin.Wochenschr.* **19**, 221-230.
- Koch R. (1890). Ueber bakteriologische Forschung. *Wien.Med.Blätt.* **13**, 531-535.
- Kochi A. (1991). The Global Tuberculosis Situation and the New Control Strategy of the World Health Organization. *Tubercle* **72**, 1-6.
- Kondo H.; Hashimoto M.; Nagata K.; Tomita K. & Tsubota H. (1992). Assay of  $\gamma$ -Glutamyltransferase with Amino Acid Dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* as Auxiliary Enzymes. *Clin.Chim.Acta* **207**, 1-9.
- Kullavanijaya P.; Sirimachan S. & Bhuddhavudhikrai P. (1993). *Mycobacterium marinum* Cutaneous Infections Acquired from Occupations and Hobbies. *Int.J.Dermatol.* **32**, 504-507.
- Launois P.; Niabg N'Diaye M.; Cartel J.L.; Mane I.; Drowart A.; van Vooren J.P.; Sarthou J.L. & Huygen K. (1995). Fibronectin-Binding Antigen 85 and the 10-Kilodalton GroES-Related Heat Shock Protein Are the Predominant Th-1 Response Inducers in Leprosy Contacts. *Infect.Immun.* **63**, 88-93.
- Lauwers A.M & Heinen W. (1983). The Properties of Enzymes from *Bacillus flavothermus*, Grown between 34 and 70 Degrees C. *Antoine-van-Leeuwenhoek.* **49**, 191-201.
- Leão S.C.; Rocha C.L.; Murillo L.A.; Parra C.A. & Patarroyo M.E. (1995). A Species-Specific Nucleotide Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Encodes a Protein that Exhibits Hemolytic Activity when Expressed in *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* **63**, 4301-4306.
- Lefkowitz D.L.; Lefkowitz S.S.; Mone J. & Everse J. (1988). Peroxidase-Induced Enhancement of Chemiluminescence by Murine Peritoneal Macrophages. *Life Sci.* **43**, 739-745.



- Leimeister-Wachter M.; Domann E. & Chakraborty T. (1991). Detection of a Gene Encoding a Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C that Is Co-Ordinately Expressed with Listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol.Microbiol.* **5**, 361-366.
- Lemassu A. & Daffe M. (1994). Structural Features of the Exocellular Polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* **297**, 351-357.
- Leopold K. & Fischer W. (1993). Molecular Analysis of the Lipoglycans of *Mycobacterium tuberculosis*. *Anal.Biochem.* **208**, 57-64.
- Lincoln J.A.; Lefkowitz D.L.; Cain T.; Castro A.; Mills K.C.; Lefkowitz S.S.; Moguilevsky N. & Bollen A. (1995). Exogenous Myeloperoxidase Enhances Bacterial Phagocytosis and Intracellular Killing by Macrophages. *Infect.Immun.* **63**, 3042-3047.
- Little M.C.; Spears P.A. & Shank D.D. (1994). Nucleotide Sequence and Strand Displacement Amplification of the 70K Protein Gene from Mycobacteria. *Mol.Cell.Probes* **8**, 375-384.
- Ljungqvist L.; Worsaae A. & Heron I. (1988). Antibody Response against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 Strains of Inbred Mice : Novel Monoclonal Antibody Specificities Generated by Fusions, Using Spleens from BALB.B10 and CBA/J Mice. *Infect.Immun.* **56**, 1994-1998.
- Ljungqvist L.; Andersen A.B.; Andersen P.; Haslov K.; Worsaae A.; Bennedsen J. & Heron I. (1990). Affinity Purification, Biological Characterization and Serological Evaluation of Defined Antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Trop.Med.Parasitol.* **41**, 333-335.
- Lowrie D.B.; Tascon R.E.; Colston M.J. & Silva C.L. (1994). Towards a DNA Vaccine against Tuberculosis. *Vaccine* **12**, 1537-1540.
- Lowrie D.B.; Ragno S.; Stavropoulos E.; Colston M.J. & Tascon R.E. (1996). Protection against Tuberculosis by DNA Vaccination. Abstract, Third International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections; June 27-30, 1996, Stockholm, Schweden.
- Luelmo F. (1982). BCG Vaccination. *Am.Rev.Resp.Dis.* **125**, 70-72.
- Mahan M.J.; Slauch J.M. & Mekalanos J.J. (1993). Selection of Bacterial Virulence Genes that Are Specifically Induced in Host Tissues. *Science* **259**, 686-688.

- Maina C.V.; Riggs P.D.; Grandea III A.G.; Slatko B.E.; Moran L.S.; Tagliamonte J.A.; McReynolds L.A. & di Guan C. (1988). An *Escherichia coli* Vector to Express and Purify Foreign Proteins by Fusion to and Separation from Maltose-Binding Protein. *Gene* **74**, 365-373.
- Mann T. (1901) Buddenbrooks. Fischer, Frankfurt.
- Mann T. (1924) Der Zauberberg. Fischer, Frankfurt.
- Mann T. (1947) Doktor Faustus. Fischer, Frankfurt.
- McCarthy J.E.G.; Sebald W.; Gross G. & Lammers R. (1986). Enhancement of Translation Efficiency by the *Escherichia coli atpE* Translation Initiation Region : Its Fusion with Two Human Genes. *Gene* **41**, 201-206.
- McCowen S.M. & Phibbs Jr. P.V. (1974). Regulation of Alanine Dehydrogenase in *Bacillus licheniformis*. *J.Bacteriol.* **118**, 590-597.
- McDonough K.A. & Kress Y. (1995). Cytotoxicity for Lung Epithelial Cells Is a Virulence-Associated Phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **63**, 4802-4811.
- McNamara P.J.; Bradley G.A. & Songer J.G. (1994). Targeted Mutagenesis of the Phospholipase D Gene Results in Decreased Virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Mol.Microbiol.* **12**, 921-930.
- McNeil M.; Daffe M. & Brennan P.J. (1990). Evidence for the Nature of the Link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial Cell Walls. *J.Biol.Chem.* **265**, 18200-18206.
- McNeil M.R. & Brennan P.J. (1991). Structure, Function and Biogenesis of the Cell Envelope of Mycobacteria in Relation to Bacterial Physiology, Pathogenesis and Drug Resistance; Some Thoughts and Possibilities Arising from Recent Structural Information. *Res.Microbiol.* **142**, 451-463.
- Mehra V; Sweetser D. & Young R.A. (1986). Efficient Mapping of Protein Antigenic Determinants. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **83**, 7013-7017.
- Mehra V.; Bloom B.R.; Bajardi A.C.; Grisso C.L.; Sieling P.A.; Alland D.; Convit J.; Fan X.D.; Hunter S.W. & Brennan P.J.; Rea T.H. & Modlin R.L. (1992). A Major T Cell Antigen of *Mycobacterium leprae* Is a 10-kD Heat-Shock Cognate Protein. *J.Exp.Med.* **175**, 275-284.

- Mekalanos J.J. (1992). Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. *J.Bacteriol.* **174**, 1-7.
- Merril C.R.; Goldman D. & van Keuren M.L. (1984). Gel Protein Stains : Silver Stain. *Methods Enzymol.* **104**, 441-447.
- Miller S.I.; Kukral A.M. & Mekalanos J.J. (1991). A Two-Component Regulatory System (*phoP phoQ*) Controls *Salmonella typhimurium* Virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **86**, 5054-5058.
- Moore L.L. & Humbert J.R. (1986). Intracellular Killing of Bacteria and Fungi. *Methods Enzymol.* **132**, 520-527.
- Müller P. & Werner D. (1982). Alanine Dehydrogenase from Bacteroids and Free Living Cells of *Rhizobium japonicum*. *Z.Naturforsch.* **37c**, 927-936.
- Mundayoor S. & Shinnick T.M. (1994). Identification of Genes Involved in the Resistance of Mycobacteria to Killing by Macrophages. *Annals N.Y.Acad.Sci.* **730**, 26-36.
- Nagata S.; Misono H.; Nagasaki S.; Esaki N.; Tanaka H. & Soda K. (1989). Thermostable Alanine Dehydrogenase of *Bacillus* sp. DSM 730 : Gene Cloning, Purification and Characterization. *Biochimie* **71**, 559-563.
- National Tuberculosis Institute, Bangalore (1974). Tuberculosis in a Rural Population of South India : a Five-Year Epidemiological Study. *Bull.WHO* **51**, 473-488.
- Nikaido H. & Jarlier V. (1991). Permeability of the Mycobacterial Cell Wall. *Res.Microbiol.* **142**, 437-443.
- Nitta Y.; Yasuda Y.; Tochikubo K. & Hachisuka Y. (1974). L-Amino Acid Dehydrogenases in *Bacillus subtilis* Spores. *J.Bacteriol.* **117**, 588-592.
- North R.J. & Izzo A.A. (1993). Mycobacterial Virulence. Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* have Faster *In Vivo* Doubling Times and Are Better Equipped to Resist Growth-Inhibiting Functions of Macrophages in the Presence and Absence of Specific Immunity. *J.Exp.Med.* **177**, 1723-1733.
- O'Connor R.J. & Halvorson H. (1961). The Substrate Specificity of L-Alanine Dehydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* **48**, 47-55.

- Ofung F.; Geluk A.; Lundin K.E.A.; Meloen R.H.; Thole J.E.R.; Mustafa A.S. & Ottenhoff T.H.M. (1994). Mapping of Multiple HLA Class II-Restricted T-Cell Epitopes of the Mycobacterial 70-Kilodalton Heat Shock Protein. *Infect.Immun.* **62**, 5411-5418.
- Ohshima T. & Soda K. (1979). Purification and Properties of Alanine Dehydrogenase from *Bacillus sphaericus*. *Eur.J.Biochem.* **100**, 29-39.
- Ohshima T.; Wandrey C. & Conrad D. (1989). Continuous Production of 3-Fluoro-L-Alanine with Alanine Dehydrogenase. *Biotechnol.Bioeng.* **34**, 394-397.
- Ohshima T.; Sakane M.; Yamazaki T. & Soda K. (1990). Thermostable Alanine Dehydrogenase from thermophilic *Bacillus sphaericus* DSM 462. *Eur.J.Biochem.* **191**, 715-720.
- Onyebujoh P.C.; Abdulmumini T.; Robinson S.; Rook G.A. & Stanford J.L. (1995). Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* as an Addition to Chemotherapy for the Treatment of Pulmonary Tuberculosis under Difficult Conditions in Africa. *Respir.Med.* **89**, 199-207.
- Ordway D.J.; Sonnenberg M.G.; Donahue S.A.; Belisle J.T. & Orme I.M. (1995). Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Exhibit a Range of Virulence for Mice. *Infect.Immun.* **63**, 741-743.
- Orme I.M., Andersen P. & Boom W.H. (1993). T Cell Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infect.Dis.* **167**, 1481-1497.
- Ostroff R.M.; Vasil A.I. & Vasil M.L. (1989). Mutations in the Hemolytic-Phospholipase C Operon Result in Decreased Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Grown under Phosphate-Limiting Conditions. *Infect.Immun.* **57**, 1369-1373.
- Pascopella L.; Collins F.M.; Martin J.M.; Lee M.H.; Hatfull G.F.; Stover C.K.; Bloom B.R. & Jacobs Jr. W.R. (1994). Use of In Vivo Complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to Identify a Genomic Fragment Associated with Virulence. *Infect.Immun.* **62**, 1313-1319.
- Pasoval G. (1993) Tuberculosis, Past, Present and Future. *J.Infection*, **27**, 5-10.
- Passador L.; Cook J.M.; Gambello M.J.; Rust L. & B.H.Iglewski B.H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes Requires Cell-To-Cell Communication. *Science* **260**, 1127-1130.

- Pedrosa J.; Florido M.; Kunze Z.M.; Castro A.G.; Portaels F.; McFadden J.; Silva M.T. & Appelberg R. (1994). Characterization of the Virulence of *Mycobacterium avium* Complex (MAC) Isolates in Mice. Clin.Exp.Immunol. **98**, 210-216.
- Petit J. & Lederer E. (1984). The Mycobacterial Cell Wall. In: The Mycobacteria, a Sourcebook. (Ed. G.P.Kubica & L.G.Wayne) Marcel Dekker, New York.
- Pick E. (1986). Microassay for Superoxide and Hydrogen Peroxide Production and Nitroblue Tetrazolium Reduction Using an Enzyme Immunoassay Microplate Reader. Methods Enzymol. **132**, 407-421.
- Plum G. & Clark-Curtiss J.E. (1994). Induction of *Mycobacterium avium* Gene Expression Following Phagocytosis by Human Macrophages. Infect.Immun. **62**, 476-483.
- Pollock J.M.; Douglas A.J.; Mackie D.P.; Neill S.D. (1995). Peptide Mapping of Bovine T-Cell Epitopes for the 38 kDa Tuberculosis Antigen. Scand.J.Immunol. **41**, 85-93.
- Porumb H.; Vancea D.; Muresan L.; Presecan E.; Lascu I.; Petrescu I.; Porumb T.; Pop R. & Barzu O. (1987). Structural and Catalytic Properties of L-Alanine Dehydrogenase from *Bacillus cereus*. J.Biol.Chem. **262**, 4610-4615.
- Prinzis S.; Chatterjee D. & Brennan P.J. (1993). Structure and Antigenicity of Lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. J.Gen.Microbiol. **139**, 2649-2658.
- Rahme L.G.; Stevens E.J.; Wolfort S.F.; Shao J.; Tompkins R.G. & Ausubel F.M. (1995). Common Virulence Factors for Bacterial Pathogenicity in Plants and Animals. Science **268**, 1899-1902.
- Ralph P. & Nakoinz I. (1975). Phagocytosis and Cytolysis by a Macrophage Tumor and its Cloned Cell Line. Nature **257**, 393-394.
- Ralph P. & Nakoinz I. (1976). Lysozyme Synthesis by a Established Human and Murine Histiocytic Lymphoma Cell Line. J.Exp.Med. **143**, 1528-1533.
- Ramakrishnan L. & Falkow S. (1994). *Mycobacterium marinum* Persists in Cultured Mammalian Cells in a Temperature-Restricted Fashion. Infect.Immun. **62**, 3222-3229.
- Raunio R.P. & Jenkins W.T. (1973). D-Alanine Oxidase from *Escherichia coli* : Localization and Induction by L-Alanine. J.Bacteriol. **115**, 560-566.

- Raveneau J.; Geoffrey C.; Beretti J.L.; Gaillard J.L.; Alouf J.E. & Berche P. ( 1992). Reduced Virulence of a *Listeria monocytogenes* Phospholipase-Deficient Mutant Obtained by Transposon Insertion into the Zinc Metalloprotease Gene. *Infect.Immun.* **60**, 916-921.
- Reiner N.E. (1994). Altered Cell Signaling and Mononuclear Phagocyte Deactivation during Intracellular Infection. *Immunol.Today* **15**, 374-381.
- Reitzer L.J. & Magasanik B.(1987). Ammonia Assimilation and the Biosynthesis of Glutamine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology. (Ed. F.C.Neidhardt; J.L.Ingraham; K.B.Low; B.Magasanik; M.Schaechter & H.E.Umbarger) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- di Rita V.J. & Mekalanos J.J. (1989). Genetic Regulation of Bacterial Virulence. *Annu.Rev.Genet.* **23**, 455-482.
- di Rita V.J. & Mekalanos J.J. (1991). Periplasmic Interaction between Two Membrane Regulatory Proteins, ToxR and ToxS, Results in Signal Transduction and Transcriptional Activation. *Cell* **64**, 29-37.
- Roach T.I.A.; Barton C.H.; Chatterjee D. & Blackwell J.M. (1993). Macrophage Activation : Lipoarabinomannan from Avirulent and Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Induces the Early Genes c-fos, KC, JE, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *J.Immunol.* **150**, 1886-1896.
- Roberts G.D.; Koneman E.W. & Kim Y.K. (1991). *Mycobacterium*. In : Manual of Clinical Microbiology. (Ed. Balows A.; W.J.Hausler Jr.; K.L. Herrmann; H.D.Isenberg & H.J.Shadomy), American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Roche P.W.; Triccas J.A.; Avery D.T.; Fifis T.; Billman-Jacobe H.; Britton W.J. (1994). Differential T Cell Responses to Mycobacteria-Secreted Proteins Distinguish Vaccination with Bacille Calmette-Guérin from Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infect.Dis.* **170**, 1326-1330.
- Roman E.; Moreno C. & Young D. (1994). Mapping of Hsp70-Binding Sites on Protein Antigens. *Eur.J.Biochem.* **222**, 65-73.
- Rouse D.A. & Morris S.L. (1995). Molecular Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Infect.Immun.* **63**, 1427-1433.

- Rowell P. & Stewart W.P.D. (1976). Alanine Dehydrogenase of the N<sub>2</sub>-Fixing Blue-Green Algae, *Anabaena cylindrica*. Arch.Microbiol. **107**, 115-124.
- Rudman D. & Meister A. (1953). Transamination in *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. **200**, 591-604.
- Ruffié J. & Sournia J.C. (1992). Die Seuchen in der Geschichte der Menschheit. dtv, Klett-Cotta, Stuttgart.
- Runyon E.H.; Wayne L.G. & Kubica G.P. (1975). Family II. *Mycobacteriaceae*. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. (Eds. R.E.Buchanan; N.E.Gibbons; S.T.Cowan; J.G.Holt; J.Liston; R.G.E.Murray; C.F.Niven; A.W.Ravin & R.Y Stanie) Williams & Wilkins, Baltimore.
- Russell D.G. (1995). Mycobacterium and Leishmania : Stowaways in the Endosomal Network. Trends Cell Biol. **5**, 125-128.
- Rydström J. (1979). Assay of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenases in Mammalian, Bacterial, and Reconstituted Systems. Methods Enzymol. **55**, 261-273.
- Sakamoto Y.; Nagata S.; Esaki N.; Tanaka H. & Soda K. (1990). Gene Cloning, Purification and Characterization of Thermostable Alanine Dehydrogenase of *Bacillus stearothermophilus*. J.Ferment.Bioeng. **69**, 154-158.
- Sakamoto Y.; Nakajima H.; Nagata K.; Esaki N. & Soda K. (1994). Large-Scale Production of Thermostable Alanine Dehydrogenase from Recombinant Cells. J.Ferment.Bioeng. **78**, 84-87.
- Sambrook J.; Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sarmiento A.M. & Appelberg R. (1995). Relationship between Virulence of *Mycobacterium avium* Strains and Induction of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Production in Infected Mice and in *In Vitro*- Cultured Mouse Macrophages. Infect.Immun. **63**, 3759-3764.
- Savage C.; Vincent P. & Leclerc H. (1993). Serodiagnosis of Tuberculosis. Evaluation of a Sulpholipid Antigen. Zentralbl.Bakt. **278**, 49-57.
- Sawa Y.; Tani M.; Murata K.; Shibata H. & Ochiai H. (1994). Purification and Characterization of Alanine Dehydrogenase from a Cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. J.Biochem. **116**, 995-1000.

- Schauder B.; Blöcker H.; Frank R. & McCarthy J.E.G. (1987). Inducible Expression Vectors Incorporating the *Escherichia coli atpE* Translation Initiation Region. *Gene* **52**, 279-283.
- Selwyn P.A.; Hartel D.; Lewis V.A.; Schoenbaum E.E.; Vermund S.H.; Klein R.S.; Walker A.T. & Friedland G.H. (1989). A Prospective Study of the Risk of Tuberculosis among Intravenous Drug Users with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N.Engl.J.Med.* **320**, 545-550.
- Shinnick T.M.; King C.H. & Quinn F.D. (1995). Molecular Biology, Virulence, and Pathogenicity of *Mycobacteria*. *Am.J.Med.Sci.* **309**, 92-98.
- Silva C.L. & Lowrie D.B. (1994). A Single Mycobacterial Protein (hsp 65) Expressed by a Transgenic Antigen-Presenting Cell Vaccinates Mice against Tuberculosis. *Immunology* **82**, 244-248.
- Silva C.L.; Silva M.F.; Pietro R.C.L.R. & Lowrie D.B. (1994). Protection against Tuberculosis by Passive Transfer with T-Cell Clones Recognizing Mycobacterial Heat-Shock Protein 65. *Immunology* **83**, 341-346.
- Singh M.; Andersen A.B.; McCarthy J.E.G.; Rohde M.; Schütte H.; Sanders E. & Timmis K.N. (1992). The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen : Overproduction in *Escherichia coli*, Purification and Characterization. *Gene* **117**, 53-60.
- Siranosian K.J.; Ireton K. & Grossman A.D. (1993). Alanine Dehydrogenase (ald) Is Required for Normal Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **175**, 6789-6796.
- Slosarek M.; Kubin M. & Pokorny J. (1994). Water as a Possible Factor of Transmission in Mycobacterial Infections. *Cent.Eur.J.Public Health* **2**, 103-105.
- Smith L.D.S. (1979) Virulence Factors of *Clostridium perfringens*. *Rev.Infect.Dis.* **1**, 254-262.
- Smith M.T. & Emerich D.W. (1993). Alanine Dehydrogenase from Soybean Nodule Bacteroids : Purification and Properties. *Arch.Biochim.Biophys.* **304**, 379-385.
- Smithwick R.W. (1976). Laboratory Manual for Acid-Fast Microscopy. 2nd ed., U.S. Departement of Health, Education and Welfare. Centers for Disease Control, Atlanta.
- Snapper S.B.; Lugosi L.; Jekkel A.; Melton R.E.; Kieser T.; Bloom B.R. & Jacobs Jr. W.R. (1988). Lysogeny and Transformation in *Mycobacteria* : Stable Expression of Foreign Genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **85**, 6987-6991.



- Snapper S.B.; Bloom B.R. & Jacobs Jr. W.R. (1990). Molecular Genetic Approaches to Mycobacterial Investigation. In: Molecular Biology of the Mycobacteria. (Ed. J.McFadden) Surrey University Press, London.
- Snider Jr. D.E. & Roper W.L. (1992). The New Tuberculosis. N.Engl.J.Med. **326**, 703-705.
- Snyderman R.; Pike M.C.; Fischer D.G. & Koren H.S. (1977). Biologic and Biochemical Activities of Continuous Macrophage Cell Lines P338D1 and J774.I. J.Immunol. **119**, 2060-2066.
- Sokolovic Z. & Goebel W. (1989). Synthesis of Listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under Heat Shock Conditions. Infect.Immun. **57**, 295-298.
- Sorensen A.L.; Nagai S.; Houen G.; Andersen P.; Andersen A.B. (1995). Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect.Immun. **63**, 1710-1717.
- d'Souza C.D.; Kadival G.V. & Samuel A.M. (1994). Use of the Recombinant 38-kDa Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as an Immunogen for Specific Antisera Production. Microbiol. Immunol. **38**, 797-800.
- Spector T. (1978). Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. A Simple and Linear Spectrophotometric Assay for <0.5 to 50 µg of Protein. Anal.Biochem. **86**, 142-146.
- Stanford J.L. & Stanford C.A. (1994). Immunotherapy of Tuberculosis with *Mycobacterium vaccae* NCTC 11659. Immunobiology **191**, 555-563.
- Stanford J.L. & Stanford C.A. (1995). In Favour of Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae*. Abstract, Conference on Global Lung Health and the 1995 Annual Meeting of the IUATLD/UICTMR, September 9-12, 1995, Paris, Frankreich.
- Steingrube V.A.; Gibson J.L.; Brown B.A.; Zhang Y.; Wilson R.W.; Rajagopalan M. & Wallace Jr. R.J. (1995). PCR Amplification and Restriction Endonuclease Analysis of a 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene Sequence for Taxonomic Separation of Rapidly Growing Mycobacteria. J.Clin.Microbiol. **33**, 149-153.
- Storey D.G.; Frank D.W.; Farinha M.A.; Kropinski A.M. & Iglewski B. (1990). Multiple Promoters Control the Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *regA* Gene. Mol.Microbiol. **4**, 499-503.

- Vancura A.; Vancurova I.; Volc J.; Jones S.K.T.; Flieger M.; Basarova G. & Behal V. (1989). Alanine Dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*. Eur.J.Biochem. **179**, 221-227.
- Vancurova I.; Vancura A.; Volc J.; Neuzil J.; Flieger M.; Basarová G. & Behal V. (1988). Purification and Partial Characterization of Alanine Dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*. Arch.Microbiol. **150**, 438-440.
- Verbon A.; Hartskeerl R.A.; Schuitema A.; Kolk A.H.J.; Young D.B. & Lathigra R. (1992). The 14,000-Molecular-Weight Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* Is Related to the Alpha-Crystallin Family of Low-Molecular-Weight Heat Shock Proteins. J.Bacteriol. **174**, 1352-1359.
- Verbon A. (1994). Development of a Serological Test for Tuberculosis. Trop.Geogr.Med. **46**, 275-279.
- Vordermeier H.M.; Harris D.P.; Lathigra R.; Roman E.; Moreno C. & Ivanyi J. (1993). Recognition of Peptide Epitopes of the 16,000 MW Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by Murine T Cells. Immunology **80**, 6-12.
- Vordermeier H.M.; Harris D.P.; Moreno C. & Ivanyi J. (1994). Promiscuous T Cell Recognition of an H-2 IA-Presented Mycobacterial Epitope. Eur.J.Immunol. **24**, 2061-2067.
- Vordermeier H.M.; Coombes A.G.A.; Jenkins P.; McGee J.P.; O'Hagan D.T.; Davis S.S. & Singh M. (1995a). Synthetic Delivery System for Tuberculosis Vaccines: Immunological Evaluation of the *M.tuberculosis* 38 kDa Protein Entrapped in Biodegradable PLG Microparticles. Vaccine **13**, 1576-1582.
- Vordermeier H.M.; Harris D.P.; Moreno C.; Singh M. & Ivanyi J. (1995b). The Nature of the Immunogen Determines the Specificity of Antibodies and T Cells to Selected Peptides of the 38 kDa Mycobacterial Antigen. Int.Immunol. **7**, 559-566.
- Wallace Jr. R.J.; Swenson J.M.; Silcox V.A.; Good R.C.; Tschen J.A. & Stone M.S. (1983). Spectrum of Disease Due to Rapidly Growing Mycobacteria. Rev.Infect.Dis. **5**, 657-679.
- Warwick-Davies J.; Lowrie D.B. & P.J.Cole P.J. (1995). Growth Hormone Activation of Human Monocytes for Superoxide Production but Not Tumor Necrosis Factor Production, Cell Adherence, or Action against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect.Immun. **63**, 4312-4316.

- Wayne L.G. & Kubica G.P. (1986). The Mycobacteria. In : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume 2. (Ed. P.H.A.Sneath; N.S.Mair; M.E.Sharpe & J.G.Holt), Williams & Wilkins, Baltimore.
- Weißborn M.; Hutter B.; Singh M.; Beeskow T.C.; Anspach F.B. (1996). Nylon-based Affinity Membranes. Purification of Recombinant L-Alanine-Dehydrogenase from Crude Fermentation Broth. *Biotechnol.Appl.Biochem.*, im Druck.
- Wietzerbin J.; Das B.C.; Petit J.F.; Lederer E.; Leyh-Bouille M. & Ghuyssen J.M. (1974). Occurrence of D-Alanyl-(D)-*meso*-Diaminopimelic Acid and *meso*-Diaminopimelyl-*meso*-Diaminopimelic Acid Interpeptide Linkages in the Peptidoglycan of Mycobacteria. *Biochemistry* **13**, 3471-3476.
- Wiame J.M. & Piérard A. (1955). Occurrence of an L(+)-Alanine-Dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *Nature* **176**, 1073-1075.
- Wick M.J.; Harding C.V.; Twesten N.J.; Normark S.J. & Pfeifer J.D. (1995). The *phoP* Locus Influences Processing and Presentation of *Salmonella typhimurium* Antigens by Activated Macrophages. *Mol.Microbiol.* **16**, 465-476.
- Wierenga R.K.; Terpstra P. & Hol W.G.J. (1986). Prediction of the Occurrence of the ADP-Binding  $\beta\alpha\beta$ -Fold in Proteins, Using an Amino Acid Sequence Fingerprint. *J.Mol.Biol.* **187**, 101-107.
- Wilkinson R.J.; Haslov K.; Rappuoli R.; Giovannoni F.; Prabhakar R.; Narayanan P.R.; Desai C.R.; Vordermeier H.M.; Paulsen J.; Pasoval G.; Ivanyi J. & Singh M. (1996). Evaluation of the Recombinant 38kD Antigen of *M.tuberculosis* as a Potential Immunodiagnostic Reagent. *J.Clin.Microbiol.* im Druck.
- Winn R.E. & Evans J.S.S. (1994). Nontuberculous Mycobacterioses. In : Infectious Diseases, Fifth Edition. (Ed. P.D.Hoeprich; M.C.Jordan & A.R.Ronald), Lippincott.
- Winn R.E. & Meier P.A. (1994). Extrapulmonary Tuberculosis. In : Infectious Diseases, Fifth Edition. (Ed. P.D.Hoeprich; M.C.Jordan & A.R.Ronald), Lippincott.
- Winn R.E. & Prechter G.C. (1994). Pulmonary Tuberculosis. In : Infectious Diseases, Fifth Edition. (Ed. P.D.Hoeprich; M.C.Jordan & A.R.Ronald), Lippincott.
- Worsaae A.; Ljungqvist L. & Heron I. (1988). Monoclonal Antibodies Produced in BALB.B10 Mice Define New Antigenic Determinants in Culture Filtrate Preparations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* **26**, 2608-2614.

- Yamaguchi M.; Hatefi Y.; Trach K. & Hoch J.A. (1988). The Primary Structure of the Mitochondrial Energy-Linked Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase Deduced from the Sequence of cDNA Clones. *J.Biol.Chem.* **263**, 2761-2767.
- Young D.B.; Kaufmann S.H.E.; Hermans P.W.M. & Thole J.E.R. (1992). Mycobacterial Protein Antigens : A Compilation. *Mol.Microbiol.* **6**, 133-145.
- Young D.B. & Cole S.T. (1993). Leprosy, Tuberculosis, and the New Genetics. *J.Bacteriol.* **175**, 1-6.
- Yoshida A. & Freese E. (1965). Enzymic Properties of Alanine Dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochim.Biophys.Acta.* **96**, 248-262.
- Young D.; Kent L.; Rees A.; Lamb J. & Ivanyi J. (1986). Immunological Activity of a 38-Kilodalton Protein Purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect.Immun.* **54**, 177-183.
- Zambardi G.; Roure C.; Boujaafar N.; Fouque B.; Freney J. & Fleurette J. (1993). Comparison of Three Primer Sets for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Samples by Polymerase Chain Reaction. *Ann.Biol.Clin.* **50**, 893-897.
- Zhang Y.; Lathigra R.; Garbe T.; Catty D. & Young D. (1991). Genetic Analysis of Superoxide Dismutase, the 23 Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol.Microbiol.* **5**, 381-391.
- Zhang Y.; Heym B.; Allen B.; Young D. & Cole S. (1992). The Catalase-Peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**, 591-593.
- Zhang Y.; Garbe T. & Young D. (1993). Transformation with *katG* Restores Isoniazid-Sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Resistant to a Range of Drug Concentrations. *Mol.Microbiol.* **8**, 521-524.
- Zhu X.; Venkataprasad N.; Thangaraj H.; Hill M.; Singh M. Ivanyi J. & Voerdermeier H.M. (1996). Functions and Specifity of T Cells Following Nucleic Acid Vaccination of Mice against *M.tuberculosis* Infection. *J.Immunol.*, eingereicht.
- Zolg J.W. & Philippi-Schulz S. (1994). The Superoxide Dismutase Gene, a Target for Detection and Identification of Mycobacteria by PCR. *J.Clin.Microbiol.* **32**, 2801-2812.

## 7. Anhänge

### Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| A                | präexponentieller Faktor oder Stoßfaktor         |
| A <sub>xxx</sub> | Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm      |
| AlaDH            | L-Alanin Dehydrogenase (E.C. 1.4.1.1.)           |
| AMC              | Academic Medical Centre, Amsterdam, Niederlande  |
| Ap               | Ampicillin                                       |
| AP               | Alkalische Phosphatase                           |
| app.             | apparent   |
| AS               | Aminosäure                                       |
| ATCC             | American Type Culture Collection, Rockville, USA |
| ATP              | Adenosin-Triphosphat                             |
|                  |  |
| BCG              | Bacille Calmette Guérin                          |
| BCIG             | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid  |
| BCIP             | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat               |
| Boc              | <i>tert</i> -Butoxycarbonyl                      |
| bp               | Basenpaar(e)                                     |
|                  |  |
| cfu              | colony forming units                             |
| Cm               | Chloramphenicol                                  |
| Conc             | Konzentration                                    |
|                  |  |
| DMEM             | Dulbecco's Modified Eagle Medium                 |
| DMF              | Dimethylformamid                                 |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                                 |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                           |
| DTNB             | Dithiobisnitrobenzoesäure                        |
| DTT              | Dithiothreitol                                   |
|                  |  |
| E <sub>a</sub>   | Aktivierungsenergie                              |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                         |
| Eth              | Ethionamid                                       |

|          |   |
|----------|---|
| F        | Farad   |
| FBS      | Fötales Rinderserum   |
| FCS      | Fötales Kalbsserum  |
| Fmoc     | 9-Flourenylmethoxycarbonyl  |
| FPLC     | Fast Protein Liquid Chromatography  |
| frag.    | Fragment  |
| <i>g</i> | Fallbeschleunigung  |
| GBF      | Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, Deutschland |
| GlcNAc   | N-Acetylglucosamin  |
| Gm       | Gentamicin  |
| GOGAT    | Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase                                       |
| GS       | Glutamin-Synthetase   |
| GST      | Glutathion-S-Transferase  |
| <i>h</i> | Stunde(n)   |
| HBSS     | Hank's Balanced Salt Solution   |
| HIV      | Human Immunodeficiency Virus  |
| HOBt     | Hydroxybenzotriazol   |
| HRP      | Horseradish Peroxidase  |
| Hsp      | Hitzeschockproteine   |
| Ig       | Immunglobulin   |
| IL       | Interleukin   |
| INH      | Isonicotinsäurehydrazid, Isoniazid  |
| IPTG     | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid  |
| <i>k</i> | Umsatzrate eines Enzyms   |
| kb       | Kilobasen   |
| KBL      | Kilobasenleiter   |
| kD, kDa  | Kilodalton  |
| KIT      | Royal Tropical Institute, Amsterdam, Niederlande                            |
| $K_M$    | Michaelis-Konstante   |
| Km       | Kanamycin   |
| $M\Phi$  | Makrophage(n)   |
| mAb      | monoklonaler Antikörper   |
| MAIS     | <i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i> - <i>M. scrofulaceum</i> Complex |

|                   |   |
|-------------------|---|
| MBP               | maltose binding protein   |
| MCAC              | Metallchelat-Affinitätschromatographie  |
| mesoDAP           | meso Diaminopimelinsäure  |
| min               | Minute(n)   |
| m.o.i.            | multiplicity of infection   |
| MRC               | Medical Research Council, Tuberculosis and Related Infections Unit, London, England |
| MTT               | Thiazolybluetetrazoliumbromid   |
| MurNAc            | N-Acetylmuraminsäure  |
| MurNGl            | N-Glycolymuraminsäure   |
| NAD <sup>+</sup>  | Nicotinamidadenindinucleotid, oxidierte Form  |
| NADH              | Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form                                       |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, oxidierte Form                                |
| NADPH             | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduzierte Form                               |
| n.b.              | nicht bestimmt  |
| NBT               | Nitrobluetetrazoliumchlorid   |
| Nr.               | Nummer  |
| NTP               | beliebiges Nucleosid in Form eines Triphosphats                                     |
| oD                | oxidative Desaminierung   |
| ORF               | open reading frame, offenes Leseraster  |
| OtBu              | tert-Butylester   |
| PAGE              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| pac               | protein antigen c, alte Bezeichnung für das 40 kD-Antigen                           |
| PCR               | polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion                                |
| Pfp               | Pentafluorphenyl  |
| PMA               | Phorbolmyristatacetat   |
| Pmc               | Pentamethylchroman  |
| PMS               | Phenazinmethosulfat   |
| PNT               | Pyridinnukleotid-Transhydrogenase   |
| PPD               | Purified protein derivative   |
| PVDF              | Polyvinylidendifluorid  |
| R                 | Rydberg-Konstante oder Resistenz (wenn Buchstabe hochgestellt)                      |
| rA                | reduktive Aminierung  |
| rec               | rekombinant   |
| Rha               | Rhamnose  |

|            |   |
|------------|---|
| Rif        | Rifampicin  |
| RIV        | National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande |
| RNA        | Ribonukleinsäure  |
| RNI        | reaktive nitrogen intermediates, reaktive Stickstoff-Intermediate               |
| ROI        | reaktive oxygen intermediates, reaktive Sauerstoff-Intermediate                 |
| rpm        | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute                                       |
| rRNA       | ribosomale Ribonukleinsäure   |
| RT         | Raumtemperatur  |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat  |
| sec        | Sekunde(n)  |
| Str        | Streptomycin  |
| Tb         | Tuberkulose   |
| TEMED      | <i>N,N,N,N</i> -Tertamethylethylendiamin  |
| TIR        | Translations-Initiationsregion  |
| Tris       | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| Trt        | Trityl  |
| ts         | temperatur-sensitiv   |
| Tween      | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat  |
| U          | Unit(s)   |
| ÜN         | über Nacht  |
| unveröff.  | unveröffentlicht  |
| $v_{\max}$ | maximale Reaktionsgeschwindigkeit   |
| VMDC       | Veterinary Microbiological Diagnostic Centre, Utrecht, Niederlande              |
| Vol.       | Volumen   |
| WHO        | World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation                          |
| WKZ        | Academisch Ziekenhuis, Utrecht, Niederlande                                     |
| z.A.       | zur Analyse, von höchstem Reinheitsgrad   |



# Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide

164

| Aminosäure   | 3-Buchstaben-Code | 1-Buchstaben-Code |
|--------------|-------------------|-------------------|
| Alanin       | Ala               | A                 |
| Arginin      | Arg               | R                 |
| Asparagin    | Asn               | N                 |
| Aspartat     | Asp               | D                 |
| Cystein      | Cys               | C                 |
| Glutamin     | Gln               | Q                 |
| Glutamat     | Glu               | E                 |
| Glycin       | Gly               | G                 |
| Histidin     | His               | H                 |
| Isoleucin    | Ile               | I                 |
| Leucin       | Leu               | L                 |
| Lysin        | Lys               | K                 |
| Methionin    | Met               | M                 |
| Phenylalanin | Phe               | F                 |
| Prolin       | Pro               | P                 |
| Serin        | Ser               | S                 |
| Threonin     | Thr               | T                 |
| Tryptophan   | Trp               | W                 |
| Tyrosin      | Tyr               | Y                 |
| Valin        | Val               | V                 |

| Base    | Nukleosid / Nukleotid | Abkürzung |
|---------|-----------------------|-----------|
| Adenin  | Adenosin              | A         |
| Cytosin | Cytidin               | C         |
| Guanin  | Guanosin              | G         |
| Uracil  | Uridin                | U         |
| Thymin  | Thymidin              | T         |

28. Januar 1997/he

Ver Zeichen: 8453  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)  
Kit und dessen Verwendung zur Tuberkulosediagnose

#### P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Enzymatischer Test-Kit zur Diagnose von Tuberkulose und anderen mycobakteriellen Infektionen in Menschen und Tieren durch Bestimmung der Aktivität von Alanindehydrogenase (E.C. 1.4.1.1).
2. Verfahren zur Diagnose von Tuberkulose und anderen mycobakteriellen Infektionen von Menschen und Tieren, dadurch **gekennzeichnet**, daß man mit einem enzymatischen Test-Kit gemäß Anspruch 1 die Aktivität von Alanindehydrogenase (E.C. 1.4.1.1.) mißt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man
  - (i) mögliche Tuberkulose-Erreger, wie *M. tuberculosis* isoliert,
  - (ii) einen Zellrohextrakt herstellt,
  - (iii) den Extrakt in Lösung inkubiert und
  - (iv) die Absorption mißt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 und/oder 3, dadurch **gekennzeichnet**, daß man klinische Proben, wie Körperflüssigkeiten, direkt einer Tuberkulosediagnose unterwirft und die Alanindehydrogenase-Aktivität mißt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Zellen, Stämme und/oder Spezies von Krankheitserregern (Mycobakterien) von nicht-virulenten Zellen und Stämmen differenziert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Zellen, Stämme und/oder Spezies von Krankheitserregern des *M. tuberculosis*-Komplexes identifiziert und differenziert.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das Verfahren in Gegenwart von Tuberkulose und andere mycobakterielle Infektionen von Menschen und Tieren inhibierenden Substanzen durchführt und diese inhibierenden Substanzen gegebenenfalls gewinnt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch **gekennzeichnet**, daß man es

- (i) zur Epidemiebekämpfung und/oder
- (ii) nach Impfungen (vaccination follow-up) bei Menschen und Tieren durchführt.

9. DNA-Sequenz, ausgewählt aus der folgenden Gruppe oder andere Teilsequenzen des Alanindehydrogenase-Gens von *M. tuberculosis* (Fig. 2.3):

| Bezeichnung | Sequenz                         | Orientierung |
|-------------|---------------------------------|--------------|
| AlaDH-F1    | 5'-ATGCGCGTCGGTATTCCG-3'        | forward      |
| AlaDH-F1+   | 5'-GCGCGTCGGTATTCCGACCG-3'      | forward      |
| AlaDH-F2    | 5'-GAGACCAAAAACAACGAA-3'        | forward      |
| AlaDH-F4    | 5'-GAATTCCCATCAGCAATCTTGCAGA-3' | forward      |
| AlaDH-F5    | 5'-GCCCCGATGAGCGAAGTC-3'        | forward      |
| AlaDH-F6    | 5'-GGGGCCGTCCTGGTGCC-3'         | forward      |
| AlaDH-F7    | 5'-GACGTCGACCTACGCGCTGAC-3'     | forward      |
| AlaDH-R1    | 5'-CTCGGTGAACGGCACCCC-3'        | reverse      |
| AlaDH-R2    | 5'-GGCCAGCACGCTGGCGGG-3'        | reverse      |
| AlaDH-R3    | 5'-CACCCGTTCCGACAGTAA-3'        | reverse      |
| AlaDH-R4    | 5'-CGCGGCCGACATCATCGC-3'        | reverse      |
| AlaDH-R5    | 5'-GGCCGACATCATCGCTTCCC-3'      | reverse      |
| AlaDH-R6    | 5'-CGAGACTAATTTGGGTGCCTTGGC-3'  | reverse      |
| AlaDH-R7    | 5'-ATTTGGGTGCCTTGGC-3'          | reverse      |
| AlaDH-RM    | 5'-GGCGGCGAGTCGACCGGC-3'        | reverse      |

sowie Teilsequenzen davon und damit vorzugsweise bei einer Temperatur von mindestens 20 °C und insbesondere bei einer Konzentration von 1 M NaCl und einer Temperatur von mindestens 25 °C hybridisierbare Sequenzen.

10. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9 zur Diagnose von Tuberkulose und anderen mycobakteriellen Infektionen bei Menschen und Tieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9

- (i) zum Hybridisieren,
- (ii) zur Bestätigung von Kulturen (culture confirmation) isolierter Stämme und/oder
- (iii) für chromosomales Fingerprinting einsetzt und Zellen, Stämme und/oder Arten von Mycobakterien ermittelt und differenziert und/oder für die Diagnose von mycobakteriellen Infektionen einsetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Zellen, Stämme und/oder Spezies von virulenten Mycobakterien von nicht-virulenten Zellen, Stämmen und/oder Spezies differenziert.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Zellen, Stämmen und/oder Spezies des *M. tuberculosis*-Komplexes und anderer Mycobakterien

- (i) isoliert,
- (ii) rohe oder gereinigte genomische DNA oder RNA gewinnt,
- (iii) ein Fragment identifiziert, das mit der Sequenz des Alanindehydrogenase-Gens von *M. tuberculosis* (Fig. 2.3) identisch oder praktisch identisch ist, vorzugsweise durch Amplifizieren unter Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9 als Primersequenz, wonach man mit einem Restriktionsenzym verdaut, insbesondere BglII, und eine Gelelektrophorese der verdauten amplifizierten DNA durchführt und/oder die DNA-Sequenz der amplifizierten DNA bestimmt.

14. Verfahren nach Anspruch 2 und/oder 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man eine klinische Probe unmittelbar einsetzt und auf Tuberkulose bei Menschen und Tieren diagnostiziert.

15. Verfahren nach Anspruch 2 und/oder 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man das Verfahren in Gegenwart von Tuberkulose oder mycobakterielle Infektionen von Menschen und Tieren inhibierenden Substanzen durchführt und ermittelte inhibierende Substanzen gewinnt oder herstellt.

16. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch **gekennzeichnet**, daß man es

- (i) bei antimycobakterieller Chemotherapie,
- (ii) bei der Epidemiekämpfung und/oder
- (iii) nach Impfungen (vaccination follow-up) bei Menschen und Tieren anwendet.

17. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 9 bei für L-Analinspezifischen Biotransformationsreaktionen.

6

## 5. Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, der jährlich über 3 Millionen Menschen zum Opfer fallen. Es gibt zwar sowohl einen Impfstoff, als auch verschiedene Diagnose- und Therapieverfahren, doch die Effektivität all dieser Maßnahmen bedarf, angesichts der wieder steigenden Zahl der Erkrankungsfälle, dringend einer Verbesserung.

Ein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Charakterisierung von Antigenen, die frühzeitig während einer Infektion sekretiert werden, da diese den ersten Kontakt des Immunsystems mit dem Erregers herstellen. Das in dieser Arbeit behandelte 40 kD-Antigen liegt *in vivo* als Hexamer vor, und ist trotz des hohen Molekulargewichts und des Fehlens einer Signalsequenz bereits nach wenigen Tagen des Wachstums extrazellulär zu finden. Es stellt funktionell eine L-Alanin Dehydrogenase dar und reagiert mit dem gegen dieses Protein gerichteten monoklonalen Antikörper HBT-10. HBT-10 war der erste bekannte Antikörper, der spezifisch für ein Protein von *M.tuberculosis* ist und nicht mit dem Impfstamm *M.bovis* BCG kreuzreagiert.

1. Das für das 40 kD-Antigen kodierende Gen war bereits in einen Plasmidvektor für *E.coli* kloniert und die Expression des resultierenden Plasmids optimiert worden. In dieser Arbeit wurde eine komplett neue Methode etabliert, die es ermöglicht, das hexamere Protein in einem Zwei-Schritt-Verfahren in löslicher und aktiver Form aufzureinigen.

2. Alle wesentlichen biochemischen Parameter des rekombinanten Enzyms wurden bestimmt. Die ermittelten Eigenschaften stehen in Einklang mit denen anderer beschriebener L-Alanin Dehydrogenasen. Das Enzym von *M.tuberculosis* ist die Alanin

Dehydrogenase mit dem niedrigsten bekannten pH-Optimum für die reduktive Aminierung.

3. Die ermittelten biochemischen Daten sprechen stark für eine Rolle des Enzyms bei einem frühen Schritt der Peptidoglycansynthese. Es stellt hierbei L-Alanin, das auch die Vorstufe von D-Alanin ist, für die Synthese der Penta- bzw. Tetrapeptidketten der N-Glycolylmuraminsäure zur Verfügung. Dies ist die erste Beschreibung dieser Aufgabe für eine L-Alanin Dehydrogenase.

4. Eine postulierte Kreuzreaktion des monoklonalen Antikörpers HBT-10 mit der PNT wurde widerlegt. Der These, das 40 kD-Antigen interveniere in das kritische Gleichgewicht zwischen NADH und NADPH, wurde dadurch eine Grundlage entzogen. Auch auf die Fähigkeit des intrazellulären Überlebens in Makrophagen hat das 40kD-Antigen, zumindest in Abwesenheit anderer mykobakterieller Proteine, keinen Einfluß.

5. Über 40 mykobakterielle Stämme wurden auf das Vorhandensein von AlaDH-Aktivität hin untersucht. Alle Stämme die AlaDH-Aktivität aufweisen, sind virulent. *M.bovis* BCG zeigt keinerlei Aktivität. Zudem scheint das Ausmaß der Aktivität mit dem Grad der Virulenz eines *M.tuberculosis*-Stammes zu korrelieren.

6. Das Gen für die Alanin Dehydrogenase wurde aus acht Stämmen des *M.tuberculosis* Complex komplett sequenziert. In den Stämmen *M.bovis* und *M.bovis* BCG wurde eine Deletion gefunden, die zu einer Leserasterverschiebung führt und für das Fehlen von meßbarer Aktivität in diesen Stämmen verantwortlich ist.

7. Das *AlaDH*-Gen aus *M.marinum* wurde identifiziert und ein Großteil der Sequenz bestimmt. Das Gen besitzt etwa 80% Identität mit dem Gen von *M.tuberculosis*.